



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MILTON JAMES JIMÉNEZ VALDIVIEZO

**EFEITOS DE UMA MISTURA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E  
ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A HOMEOSTASE  
TECIDUAL DE LEITÕES DESMAMADOS DESAFIADOS A  
*Escherichia coli* ENTEROTÓXICA (ETEC)**

---

Londrina  
2019

MILTON JAMES JIMÉNEZ VALDIVIEZO

**EFEITOS DE UMA MISTURA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E  
ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A HOMEOSTASE  
TECIDUAL DE LEITÕES DESMAMADOS DESAFIADOS A  
*Escherichia coli* ENTEROTÓXICA (ETEC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula F.R.L. Bracarense

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Jiménez, Milton James.

Efeitos de uma mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial de canela sobre a homeostase tecidual de leitões desmamados desafiados a *Escherichia coli* enterotóxica (ETEC) / Milton James Jiménez. - Londrina, 2019.

113 f. : il.

Orientador: Ana Paula Bracarense.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Avaliação - Tese. 2. Comparação - Tese. I. Bracarense, Ana Paula. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . III. Título.

MILTON JAMES JIMÉNEZ VALDIVIEZO

**EFEITOS DE UMA MISTURA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E  
ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA SOBRE A HOMEOSTASE  
TECIDUAL DE LEITÕES DESMAMADOS DESAFIADOS A  
*Escherichia coli* ENTEROTÓXICA (ETEC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Paula F.R.L.  
Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Caio Abércio Da Silva  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Rubira Gerez  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2019.

**Dedico de maneira especial à  
minha mãe, porque tem sido  
minha inspiração para ser cada  
dia melhor. Ao meu pai, por ser  
um exemplo a seguir e aos meus  
irmãos e amigos que são uma  
fonte de luz para mim.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado. À Capes, pelo financiamento econômico para a finalização desta dissertação, através da concessão de bolsa de pesquisa.

À professora Dra. Ana Paula F.R.L. Bracarense pela orientação e oportunidade de ser seu orientado no mestrado, agradeço também sua compressão e sua enorme paciência. Obrigado pelo rigor, pela inspiração, pelo exemplo intelectual e pela amizade construída durante este curto período de tempo, obrigado por tudo Professora!

Ao Laboratório de Patologia Animal: aos professores, aos pós-graduandos, aos residentes, aos técnicos e aos bolsistas de iniciação científica pela constante ajuda e amizade em todo momento. Agradeço de uma maneira especial a Juliana e Thalita pela ajuda fornecida durante o desenvolvimento do projeto, pelas dicas e por todas as risadas, fazendo com que minha estadia no laboratório fosse mais produtiva e divertida.

Ao pessoal do Laboratório de Medicina Aviária, principalmente à professora Dra. Ana Angelita, Marielen e Maísa, ao Laboratório de Análise de materiais e moléculas em especial a Miriam, e ao pessoal da Fazenda escola que me ajudaram muito no desenvolvimento do projeto. À Biomim pelo financiamento econômico para o desenvolvimento da parte experimental do projeto.

À minha mãe por ser a principal promotora dos meus sonhos, pelo apoio ilimitado e incondicional, por ter sempre a força para continuar independentemente dos obstáculos. Obrigado por acreditar e confiar em mim, agradeço a Deus pela vida de minha mãe, e graças à vida por permitir que eu a veja e aproveite cada dia ao seu lado.

Ao meu pai, pela coragem que você sempre teve de levantar diante de qualquer adversidade, pelos ensinamentos que o senhor me deu e por me encorajar, sempre dizendo o quanto se sente orgulhoso por seu filho.

Aos meus irmãos, que têm sido minha inspiração para ser melhor a cada dia e por me mostrar que em todos os momentos posso contar com vocês.

Aos meus amigos do Equador, pela amizade e companhia na distância, também aos amigos de Londrina, pelo tempo de amizade e pelos momentos agradáveis que passamos juntos nesta cidade.

Muito obrigado novamente a todos pelo apoio!!!

**Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.**

(São Francisco de Assis)

JIMÉNEZ-VALDIVIEZO, Milton James. **Efeitos de uma mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial de canela sobre a homeostase tecidual de leitões desmamados desafiados a *Escherichia coli* enterotóxica (ETEC)**. 2018. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Os ácidos orgânicos e óleos essenciais têm uma longa história de uso na alimentação de suínos devido aos seus efeitos sobre o desempenho, morfologia intestinal, e sobre as bactérias patogênicas intestinais. No entanto, poucos estudos avaliaram os efeitos interativos destes aditivos sobre a integridade intestinal e outros tecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de uma mistura comercial (CB) de ácidos orgânicos e óleo essencial de canela na homeostase tecidual de leitões desafiados a *Escherichia coli* enterotóxica, como uma possível alternativa à medicação preventiva com antibióticos. 30 leitões desmamados de 21 dias de idade com peso corporal de  $6,06 \pm 0,25$  kg foram utilizados neste experimento. Os leitões foram submetidos durante sete dias a uma dieta padrão e depois distribuídos a cinco tratamentos dietéticos num delineamento casualizado. Os tratamentos dietéticos foram: 1) controle: dieta basal livre de desafio e tratamentos desafiados: 2) *Escherichia coli*, dieta basal sem aditivos; 3) colistina, dieta basal suplementada com 200 ppm de colistina + *E. coli*; 4) CB1, dieta basal com 1 kg de mistura comercial/ton + *E. coli*; e 5) CB2, dieta basal com 2 kg de mistura comercial /ton + *E. coli*. Sete dias após o início do tratamento, os animais foram desafiados com 5ml ( $1,1 \times 10^9$  UFC/mL) de uma cepa enterotóxica de *E. coli* (K88). Cinco dias após o desafio, os animais foram eutanasiados para amostragem de jejuno, íleo, fígado, rim, pulmão, baço e linfonodo mesentérico para análise histológica. Os cortes histológicos foram analisados para determinar o escore da lesão; a altura das vilosidades (AV), a profundidade das criptas (PC), proliferação celular e o número de células inflamatórias também foram mensurados no intestino. Amostras de intestino delgado e fígado também foram coletadas para determinar a capacidade antioxidante e a resposta oxidativa por meio de ensaios espectrofotométricos. A capacidade antioxidante foi determinada pelos ensaios de GSH, FRAP e ABTS, enquanto os ensaios de TBARS e NBT foram usados para determinar a resposta oxidativa. As médias dos dados foram submetidas à análise estatística (ANOVA e teste de Tukey) considerando  $P \leq 0,05$ . Animais alimentados com a mistura comercial (CB1-2) apresentaram uma diminuição ( $P < 0,05$ ) nas alterações histológicas no intestino delgado, fígado e órgãos linfoides quando comparados ao grupo *E. coli*, no entanto, não apresentaram significância com o grupo colistina. Foram observadas maiores AV, uma maior relação entre a AV:PC e uma redução ( $P < 0,05$ ) no número da células inflamatórias no intestino delgado do grupo CB2 em comparação com o grupo *E. coli*, mas esses resultados não diferiram dos animais suplementados com colistina. A suplementação com CB2 induziu uma diminuição ( $P < 0,05$ ) na concentração de TBARS e NBT no intestino delgado e fígado, e uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) nos níveis de ABTS no fígado em comparação com o grupo *E. coli*. Um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos níveis de GSH e FRAP no íleo foram observados em relação ao grupo *E. coli*. A inclusão de mistura comercial na dieta, especialmente na dose de 2kg / ton (CB2), protegeu a mucosa intestinal, fígado e órgãos linfoides contra danos causados pelo desafio bacteriano.

**Palavras-chaves:** intestino delgado; fígado; órgãos linfoides; colistina; estresse oxidativo.

JIMÉNEZ-VALDIVIEZO, Milton James. **Effects of a mixture of organic acids and cinnamon essential oil on the tissue homeostasis of weaned piglets challenge with Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)**. 2018. 113 p. Dissertation (Master's in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Organic acids and essential oils have a long history of use in pig feeding due to their effects on performance, intestinal morphology, and on intestinal pathogenic bacteria. However, few studies have evaluated the interactive effects of the organic acids and essential oils on the intestinal integrity and other tissues. Therefore, the aim of this study was to assess the impact of a commercial blend (CB) of organic acids and cinnamon essential oil on tissue homeostasis of weaned piglets exposed to enterotoxigenic *Escherichia coli*, as a possible alternative to preventive medication with antibiotics. Thirty weaned piglets from 21 d of age with a body weight of  $6.06 \pm 0.25$  kg were used in this experiment. Pigs were subject during seven days to a standard diet and then were allotted to five dietary treatments in a randomized design, using six replicates per treatment. Dietary treatments were: 1) control: basal diet free of challenge and challenged treatments: 2) *Escherichia coli*, basal diet without additives; 3) colistin, basal diet supplemented with 200 ppm of colistin + *E. coli*; 4) CB1, basal diet with 1 kg commercial blend/ton + *E. coli*; and 5) CB2, basal diet with 2 kg commercial blend/ton+ *E. coli*. Seven days after the beginning of the treatment, the animals were challenged with an enterotoxigenic strain ( $1.1 \times 10^9$  CFU/mL) of *E. coli* (K88) for pigs. Five days after the challenge, all animals were euthanized for sampling of jejunum, ileum, liver, kidney, lung, spleen and mesenteric lymph node for histological analysis. The histological sections were analyzed to determine the lesion score; villi height (VH), crypt depth (CD), cell proliferation and the number of inflammatory cells were also measured in the intestine. Small intestine and liver samples were also collected to determine the antioxidant capacity and oxidative response by spectrophotometric assays. Antioxidant capacity was determined by the GSH, FRAP and ABTS assays, while the TBARS and NBT assays were used to determine the oxidative response. The data means were submitted to statistical analysis (ANOVA and Tukey's test) considering  $P \leq 0.05$ . Animals fed the commercial blend (CB 1-2) presented a significant decrease ( $P < 0.05$ ) on histological changes on the small intestine, liver, and lymphoid organs when compared to the *E. coli* group, however, they did not present significance with the group colistin. Greater VH, a higher VH:CD ratio and a reduction ( $P < 0.05$ ) in the number of inflammatory cells in the small intestine of the CB2 group compared with the *E. coli* group were observed, but these results did not differ from the animals supplemented with colistin. CB2 supplementation induced a decrease ( $P < 0.05$ ) in TBARS and NBT concentration in the small intestine and liver and a reduction ( $P < 0.05$ ) in ABTS levels in the liver compared to the *E. coli* group. An increase ( $P < 0.05$ ) in GSH and FRAP ileal levels was observed in relation to the *E. coli* group. The inclusion of commercial blend in the diet, especially at a dose of 2kg / ton (CB2) protected the intestinal mucosa liver and lymphoid organs against damage caused by bacterial challenge.

**Keywords:** small intestine. liver; lymphoid organs; colistin; oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Artigo A – Effects of a blend of organic acids and cinnamon essential oil on intestinal homeostasis of piglets exposed to enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)</b> .....	47
<b>Fig.1 –</b> Jejunum of piglets submitted to different treatments .....	70
<b>Fig.2 –</b> Effects of different treatments on the lesional score in the jejunum and ileum of piglets .....	70
<b>Fig.3 –</b> Effects of colistin and commercial blend on intestinal bacterial adhesion.....	71
<b>Fig.4 –</b> Effects of colistin and commercial blend on jejunum and ileum villi height and crypt depth .....	71
<b>Fig.5 –</b> Effects on the number of inflammatory cells in the jejunum and ileum .....	72
<b>Artigo B – Systemic effects of a blend of organic acids and cinnamon essential oil in piglets exposed to enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (EETEC)</b> .....	73
<b>Figure 1 –</b> Effects of colistin and commercial blend on the liver .....	92
<b>Figure 2 –</b> Effects of colistin and commercial blend on the lymph node .....	93
<b>Figure 3 –</b> Effects of colistin and commercial blend on the spleen .....	94
<b>Figure 4 –</b> Effects of colistin and commercial blend on the kidney.....	95
<b>Figure 5 –</b> Effects of colistin and commercial blend on the lung .....	96
<b>Figure 6 –</b> Effects of colistin and commercial blend on hepatic oxidative stress .....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Artigo A – Effects of a blend of organic acids and cinnamon essential oil on intestinal homeostasis of piglets exposed to enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC).....</b>	<b>47</b>
<b>Table 1 – Centesimal and nutritional composition of the experimental diets .....</b>	<b>67</b>
<b>Table 2 – Establishment of a lesion score – endpoints used to assess histological lesions .....</b>	<b>68</b>
<b>Table 3 – Effects on the mean number of mitotic figures on intestinal crypts of pigs submitted to different treatments .....</b>	<b>68</b>
<b>Table 4 – Redox status in tissues from piglets fed experimental diets .....</b>	<b>69</b>
<b>Artigo B – Systemic effects of a blend of organic acids and cinnamon essential oil in piglets exposed to enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC) .....</b>	<b>73</b>
<b>Table 1 – Centesimal and nutritional composition of the experimental rations .....</b>	<b>90</b>
<b>Table 2 – Establishment of a lesion score – endpoints used to assess histological lesions .....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Capacidade de eliminação de radicais livres
AIDA	Adesina envolvida na aderência difusa
AGP	Antibióticos promotores de crescimento
AND	Diarreia neonatal
ANOVA	Análise de Variância
CB	Mistura comercial
CD	Profundidade de cripta
CFU	Unidade formadoras de colônias
CM	Mastite coliforme
CS	Sulfato de colistina
ED	Doença de edema
EO	Óleo essencial
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotóxica
FRAP	Potencial de capacidade de redução férrica
GSH	Glutathiona reduzida
GIT	Trato gastrointestinal
LT	Toxinas termoelétricas
NBT	Redução de nitroblue tetrazolium
OA	Ácido orgânico
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de acidez
PWD	Diarreia pós-desmame
ST	Toxinas termostáticas
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VH	Altura da vilosidade
UTI	Infecção do trato urinário

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1	DESMAME.....	4
2.1.1	Alterações Morfológicas e Adaptações Fisiológicas do Trato Digestório de Leitões no Desmame .....	5
2.2	DIARREIA PÓS-DESMAME (PWD).....	7
2.2.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	9
2.2.2.	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	9
2.2.3.	Tratamento e Profilaxia .....	11
2.3	COLISTINA.....	12
2.4	ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	13
2.4.1.	Usos dos Ácidos Orgânicos.....	14
2.4.2.	Mecanismo de Ação Antimicrobiana dos Ácidos Orgânicos.....	15
2.4.3.	Efeitos Benéficos dos Ácidos Orgânicos em Suínos.....	17
2.4.4.	Características e Efeitos dos Ácidos Orgânicos Individuais .....	18
2.4.5.	Fatores que Afetam a Eficácia dos Ácidos Orgânicos .....	22
2.5	EXTRATOS VEGETAIS: ADITIVOS FITOGÊNICOS .....	23
2.5.1.	Óleos Essenciais .....	23
2.6	COMBINAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
3.1	OBJETIVO GERAL .....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>4.</b>	<b>ARTIGO A– EFFECTS OF A BLEND OF ORGANIC ACIDS AND CINNAMON ESSENTIAL OIL ON INTESTINAL HOMEOSTASIS OF PIGLETS EXPOSED TO ENTEROTOXIC <i>Escherichia coli</i> (ETEC).</b> .....	47

<b>5.</b>	<b>ARTIGO B– SYSTEMIC EFFECTS OF A BLEND OF ORGANIC ACIDS AND CINNAMON ESSENTIAL OIL IN PIGLETS EXPOSED TO ENTEROTOXIC <i>Escherichia coli</i> (ETEC).....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desmame é um evento estressante e complexo, caracterizado por mudanças na dieta e condições sociais e ambientais, que afeta profundamente a saúde dos leitões e leva a uma baixa ingestão de alimentos, ao declínio do desempenho e, em muitos casos, à morte (LE DIVIDICH; SÈVE, 2000). Esses diversos fatores têm consequências críticas no comportamento dos leitões e na fisiologia do trato gastrointestinal ainda imaturo (LALLÈS et al., 2007). Entre as principais alterações gastrointestinais que têm sido associadas ao desmame estão a atrofia do intestino delgado e redução da altura de vilosidades, diminuição da absorção de fluidos, nutrientes e eletrólitos, aumento da permeabilidade a antígenos e toxinas e modificações na microbiota intestinal (MONTAGNE et al., 2007). Essas alterações podem estar envolvidas na etiologia da diarreia pós-desmame (PWD) e outras infecções entéricas (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997).

O principal agente infeccioso da PWD em leitões é *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), sendo responsável pela morte de um elevado número de leitões desmamados (FRANCIS, 2002). Entre outros agentes etiológicos bacterianos na fase de creche destacam-se: *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella typhimurium* e *Brachyspira* spp. (BACCARO et al., 2003). O conhecimento dos patógenos responsáveis pelas diarreias em suínos é uma importante ferramenta para o diagnóstico das doenças causadas pelos mesmos. Desta forma, podem ser tomadas medidas de tratamento e controle, minimizando as perdas econômicas (ZLOTOWSKI et al., 2008).

Um grande desafio que a indústria suína enfrenta hoje é identificar maneiras de controlar a diarreia em suínos jovens, que não apenas sejam lucrativas, mas também apropriadas para a produção sustentável de suínos. Doses sub-terapêuticas de antibióticos têm sido usadas em dietas de leitões para melhorar o desempenho do crescimento e lidar com o problema da diarreia (KYRIAKIS et al., 1999). Dentro destes antibióticos temos a colistina que, por sua atividade contra as bactérias Gram-negativas, tem sido amplamente utilizada para o controle da diarreia pós-desmame em suínos (KEMPF et al., 2013).

No entanto, o risco de desenvolvimento de bactérias multirresistentes levou à proibição de diversos antibióticos em alimentos (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001). Portanto, existe uma necessidade urgente de desenvolver estratégias alternativas não-antibióticas para o controle de infecções associadas ao desmame e manter a produtividade dos leitões ao mesmo tempo (RHOUMA et al., 2017). Após a proibição dos promotores de crescimento a base de antibióticos, uma diversidade de aditivos alimentares tem sido estudada

como alternativas, avaliando seu potencial na redução da proliferação de ETEC, incidência de diarreia pós-desmame e melhora da saúde intestinal e desempenho de leitões desmamados (HALAS et al., 2009; SEAL et al., 2013). Considerando seu potencial mecanismo de ação, os ácidos orgânicos e óleos essenciais podem ser o tipo mais relevante de aditivos para desenvolver uma estratégia de alimentação sem antibióticos (OMONIJO et al., 2017; ZHAI et al., 2018).

Ácidos orgânicos (AO) como fórmico, propiônico, benzóico, fumárico, láctico e cítrico, já são utilizados em doses elevadas na ração de leitões devido aos seus efeitos bacteriostáticos e bactericidas (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015), além de apresentarem efeitos benéficos sobre o trato gastrointestinal (GIT) (RHOUMA et al., 2017). Sua atividade antimicrobiana é dada principalmente pela diminuição do pH da dieta e do trato digestório, criando um ambiente hostil para a sobrevivência de bactérias coliformes e um meio favorável para bactérias lácticas (GONG et al., 2008). Assim, também devido à capacidade da forma não dissociada de ácidos orgânicos penetrar na parede celular das bactérias e alterar sua fisiologia normal, tornam-se agentes antimicrobianos eficazes (PAPATSIROS; BILLINIS, 2012)

A adição de AO ou seus sais às dietas para leitões desmamados demonstrou melhorar o desempenho do crescimento (PARTANEN et al., 2007; BRAZ et al., 2011; SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015) e a saúde gastrintestinal (HEO et al., 2013). Tem sido relatado que o uso de AO na ração reduz a incidência e a severidade da diarreia em suínos (TSILOYIANNIS et al., 2001). Além disso, os AO poderiam promover o desenvolvimento da mucosa intestinal em leitões desmamados, reduzindo os valores de pH da digesta e mantendo o equilíbrio da microbiota (DIAO et al., 2014).

As plantas produzem um grande número de metabólitos secundários ou fitoquímicos que são usados em grande parte como um mecanismo de defesa contra microrganismos e outros predadores (SULTANBAWA, 2011). Óleos essenciais, terpenoides, compostos fenólicos, polipeptídios, alcaloides e poliacetilenos são os principais fitoquímicos presentes nas plantas (COWAN, 1999). Óleos essenciais (OE), também chamados de voláteis, são uma mistura complexa de compostos naturais obtidos de plantas aromáticas por vários processos, sendo que o método mais utilizado comercialmente é a destilação a vapor (BURT, 2004).

Os OE têm duas classes principais de compostos, terpenos (por exemplo, timol e carvacrol) e fenilpropenos (por exemplo, eugenol e cinamaldeído) (OMONIJO et al., 2017). Foi reconhecido que os OE possuem propriedades antimicrobianas, antivirais, antimicóticas, antitoxigênicas, antiparasitárias, anti-inflamatórias, antioxidantes e inseticidas (BURT, 2004;

REICHLING et al., 2009; OMONIJO et al., 2017). A propriedade antibacteriana dos óleos essenciais e seus componentes é dada principalmente pela sua hidrofobicidade, o que lhes permite interagir com os lipídios da membrana celular bacteriana e torná-la mais permeável, levando à morte (BURT, 2004). Vários estudos mostraram os efeitos benéficos dos OE no desempenho de aves e suínos (FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010; ZENG et al., 2015a).

Recentemente, os estudos indicaram que a adição da combinação de AO e OE na dieta de leitões desmamados oferece um possível efeito combinado, especialmente no desempenho produtivo (CHO; KIM, 2015; XU et al., 2018). A partir de estudos anteriores com AO e OE em suínos desmamados, foi analisado que a maioria das avaliações se concentraram principalmente no desempenho e na saúde intestinal, sendo que poucos são os estudos que avaliaram o efeito sistêmico da combinação destes aditivos em suínos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos sistêmicos de uma mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial de canela sobre o intestino, fígado, órgãos linfoides, rim e pulmão de leitões desafiados à *Escherichia coli* enterotóxica, como uma alternativa possível à medicação preventiva com antibióticos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DESMAME

Nas últimas décadas, na suinocultura, observou-se a ocorrência de uma redução na idade de desmame dos leitões, de oito para cerca de três semanas. A redução na idade de desmame dos leitões é uma prática que está sendo amplamente adotada pela indústria suinícola, objetivando melhoria no desempenho e produtividade das matrizes (CHAMONE et al., 2010).

O chamado desmame precoce, também se justifica por ser o período onde a produção de leite da fêmea começa a diminuir ao passo que a velocidade de crescimento dos leitões aumenta, então o leite já não atende as necessidades de crescimento, sendo necessário o fornecimento de ração, aproveitando-se assim para realizar o desmame (SANTOS; MASCARENHAS; OLIVEIRA, 2016).

O desmame é um dos períodos mais estressantes para o leitão, que resulta em alterações intestinais, imunológicas e comportamentais. Durante este tempo os leitões são submetidos a uma série de situações estressantes como: separação abrupta da porca, transporte, estresse de movimentação, contato com uma fonte de alimento distinta do leite, reorganização da hierarquia social, mistura com leitões de outras ninhadas, ambiente físico diferente, aumento da exposição a agentes patogênicos e antígenos dietéticos ou ambientais (LE DIVIDICH; HERPIN, 1994; CAMPBELL; CRENSHAW; POLO, 2013). Essas mudanças podem contribuir diretamente para uma baixa taxa de crescimento dos leitões após o desmame, ou induzir a atrofia das vilosidades e a hiperplasia das criptas intestinais, que leva a uma diminuição temporária da capacidade digestiva e absorptiva do intestino delgado (HAMPSON, 1986; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997).

Geralmente o desmame resulta em um período crítico de baixo consumo voluntário, durante o qual o leitão está se adaptando à dieta inicial (LE DIVIDICH; SÈVE, 2000). Não há dúvida de que a reduzida ingestão de alimentos e o baixo crescimento associado após o desmame são principais limitações para uma maior eficiência na produção de suínos (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), portanto, o comportamento dos leitões, durante esse período, irá influenciar, em grande parte sobre o desempenho final do animal (MAHAN; LEPINE, 1991).

### 2.1.1. Alterações Morfológicas e Adaptações Fisiológicas do Trato Digestório de Leitões no Desmame

O sistema digestório tem múltiplas funções, como digestão e absorção de nutrientes e eletrólitos; manutenção do equilíbrio dos fluidos corporais; secreção de enzimas digestivas, mucina, imunoglobulinas e vários outros componentes; e servir de barreira para o hospedeiro contra patógenos prejudiciais e antígenos (CAMPBELL; CRENSHAW; POLO, 2013).

Os distúrbios no sistema digestório pós-desmame em suínos resultam não somente de alterações na arquitetura e função do GIT (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), mas também de mudanças importantes na microbiota entérica adaptável (KONSTANTINOV et al., 2004) e nas respostas imunológicas (BAILEY et al., 2005). Sem dúvida, todos esses aspectos da fisiologia, microbiologia e imunologia do sistema digestório contribuem de forma interativa para manter o balanço da saúde intestinal (LALLÈS et al., 2007).

Durante a fase de amamentação o leitão recebe um alimento com alta digestibilidade, rico em gordura, lactose e caseína. Com o desmame, os leitões ficam submetidos às rações secas, passam a receber amido, óleos e proteínas vegetais, para as quais ainda não apresentam um sistema digestório adequadamente desenvolvido (CHAMONE et al., 2010). Sendo assim, o sistema digestório dos leitões precisam passar por modificações até que esteja preparado para a digestão de ingredientes de origem vegetal (TEIXEIRA et al., 2003). A primeira delas é o aumento na produção de enzimas pancreáticas e das glândulas anexas da digestão, assim como também a variação do pH gástrico e motilidade do intestino (MAKKINK et al., 1994).

Durante a ingestão, o alimento estimula o estômago a secretar suco gástrico. O suco gástrico apresenta um pH entre 2.0 e 3.5, sendo composto por ácido clorídrico (HCl), pepsinas e lipase gástrica (SANTOS; MASCARENHAS; OLIVEIRA, 2016). Nas primeiras semanas após o desmame os leitões produzem quantidade insuficiente de suco gástrico; atribuída ao fato de que o mecanismo que controla a secreção de ácidos-bases necessita de 8 a 9 semanas para o seu desenvolvimento completo (PROHÁSZKA; BARON, 2010). Além de sua influência na digestão de nutrientes, a manutenção de um baixo valor de pH gástrico é essencial para um intestino saudável, porque pode ajudar a reduzir a passagem de bactérias patogênicas para o intestino delgado. O alto pH gástrico após o desmame pode contribuir, em parte, para aumentar a susceptibilidade de leitões às infecções entéricas (HEO et al., 2013).

A pepsina é responsável pela digestão das proteínas e é formada a partir do pepsinogênio (SANTOS; MASCARENHAS; OLIVEIRA, 2016). A pepsina só é ativada quando o pH do estômago atinge valores menores do que dois; devido a que nesse pH, o HCl converte o pepsinogênio em pepsina (KHAN et al., 1999). No desmame o leitão tem dificuldades para manter o pH do estômago baixo, comprometendo a eficiência da produção de pepsina (SOARES, 2004).

O efeito do desmame sobre a atividade das enzimas gástricas é controverso. Diminuição da atividade da pepsina na mucosa do estômago nos primeiros cinco dias após o desmame sem alterar a atividade da lipase foi relatada (HEDEMANN; JENSEN, 2004); entretanto, outros estudos relataram aumento da atividade da pepsina e lipase na mucosa do estômago após o desmame (CRANWELL, 1985; JENSEN; JENSEN; JAKOBSEN, 1997). O desmame também reduz a motilidade gástrica, sendo mais prolongada após o desmame e mais encurtada com o passar do tempo (SNOECK et al., 2004).

O pâncreas tem importante função na digestão dos alimentos ingeridos, mediante a produção de suco pancreático, que possui enzimas que atuam na digestão do amido (amilase), das proteínas (tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases) e das gorduras (lipases); sua produção é praticamente constante durante a lactação, mas diminui ao desmame devido à redução no consumo de alimento (ROPPA, 1998). No entanto, outros estudos relataram que o pâncreas apresenta baixa capacidade de síntese de enzimas digestivas enquanto os leitões são lactantes (exceto para a lipase), e que aumenta ao desmame. De acordo com esses autores seu maior desenvolvimento ocorre dentro dos primeiros cinco dias após o desmame, sendo importantes fatores para a indução da maturação pancreática a frequência de alimentação, a natureza da dieta e a idade dos leitões (PIERZYNOWSKI et al., 1995; RANTZER et al., 1997).

Mudanças significativas ocorrem na estrutura e na função do intestino delgado durante o período imediato pós-desmame (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Estudos relataram que há redução na altura das vilosidades e aumento na profundidade das criptas intestinais após o desmame (BOUDRY et al., 2004; MONTAGNE et al., 2007; VERDONK et al., 2007). Essas alterações resultam na diminuição da capacidade digestiva, absorptiva e secretora do intestino delgado (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997), e, em última instância, diminuição da função de barreira intestinal, contribuindo para a ocorrência da diarreia pós-desmame (CAMPBELL; CRENSHAW; POLO, 2013).

A anorexia pós-desmame foi sugerida como o principal fator etiológico da redução na altura das vilosidades e de aumento na profundidade das criptas (MCCRACKEN et al., 1999). No entanto, outros autores sugeriram que há mudanças morfológicas na arquitetura

intestinal (redução na altura das vilosidades) após o desmame, mesmo na presença de fornecimento contínuo de nutrientes (KELLY; SMYTH; MCCRACKEN, 1991). Além de uma baixa ingestão de ração após o desmame, outros fatores podem ser parcialmente responsáveis pela atrofia das vilosidades (HEO et al., 2013), como por exemplo o estresse do desmame, fato associado à separação dos leitões da porca, que contribui parcialmente na alteração da arquitetura intestinal (VAN BEERS-SCHREURS et al., 1998).

A atrofia das vilosidades após o desmame é causada por uma maior taxa de perda de células ou uma taxa reduzida de renovação celular (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Se o encurtamento das vilosidades ocorre através de uma taxa aumentada de perda de células, isso está associado ao aumento da produção de células das criptas e, portanto, aumenta a profundidade da cripta. No entanto, a atrofia das vilosidades também pode ser devido a uma diminuição da taxa de renovação celular que é o resultado da redução da divisão celular nas criptas (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997).

Embora o sistema digestório dos leitões tenha se desenvolvido e suas estruturas venham se adaptar à dieta, o desmame exige medidas que ofereçam melhores condições de adaptação desses animais, para isto, especialmente nas duas primeiras semanas após o desmame, é comum a utilização de ingredientes mais digestíveis, como produtos lácteos, além de alimentos processados (GRECCO, 2014). Porém, por mais digestíveis e complexas que sejam as dietas, os leitões recém-desmamados não conseguem suprir suas exigências nutricionais, pois o seu consumo logo após o desmame, é relativamente baixo (UTIYAMA, 2004).

## 2.2 DIARREIA PÓS-DESMAME (PWD)

As doenças entéricas representam um problema importante na indústria de suínos devido às grandes perdas econômicas associadas a gastos com antibióticos, aumento da mortalidade, necessidade de manejo e cuidados com os animais doentes e piora de conversão alimentar (HOLLAND, 1990).

Os mecanismos determinantes para manifestação clínica das infecções entéricas resultam primariamente de alterações fisiológicas no transporte intestinal de água e eletrólitos (ARGENZIO, 1992). O desequilíbrio entre os mecanismos absorptivos, secretórios e regulatórios próprios do epitélio intestinal promove expressiva perda de fluidos e compromete a absorção de nutrientes (VANNUCCI; GUEDES, 2009).

A diarreia pós-desmame é uma condição dos leitões desmamados caracterizada pela descarga frequente de fezes aquosas durante as primeiras semanas após o desmame (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). Embora *E. coli* enterotoxigênica seja claramente importante na etiologia da diarreia pós-desmame, outros fatores como: falhas de manejo, ambiente inapropriado, nutrição inadequada e baixa imunidade (BRITO; FILIPPSEN; MORES, 1995) podem favorecer o aparecimento de distúrbios digestivos (MADEC et al., 2000).

A ingestão de alimento durante a primeira semana pós-desmame está fortemente relacionada com o risco de ocorrência de diarreia no período pós-desmame (MADEC et al., 1998). Também se tem observado um aumento significativo do risco de diarreia pós-desmame em leitegadas que sofreram de diarreia durante a lactação (SVENSMARK et al., 1989).

Sugere-se que os dois fatores que mais influenciam a ocorrência de diarreia pós-desmame são a idade e o peso ao desmame. Desmames com menos de duas semanas de idade ou com menos de 3 kg de peso corporal estão associados ao aumento na taxa de incidência de diarreia (HESS; BACHMANN, 1981; SVENSMARK et al., 1989). Isso está provavelmente associado com uma complexa interação entre características fisiológicas e imunológicas do trato digestório dos leitões, assim também ao efeito de agentes infecciosos (HESS; BACHMANN, 1981).

A imaturidade do sistema imunológico intestinal e a diminuição na ingestão de IgA e outros compostos bioativos derivados do colostro contribuem para a susceptibilidade dos animais a doenças entéricas. Essa imaturidade do sistema imunológico intestinal pode reduzir a capacidade do leitão desmamado para elaborar uma resposta imunológica adequada aos agentes patogênicos (BAILEY et al., 2005).

A diarreia pós-desmame é tipicamente associada à disseminação fecal de grande número de sorotipos enterotoxigênicos de *E. coli*  $\beta$ -hemolíticos que proliferam particularmente no intestino delgado após o desmame (SCHIERACK et al., 2006). Por esta razão, a diarreia pós-desmame às vezes é também chamada de colibacilose pós-desmame, sendo que a maioria dos surtos ocorrem nos leitões desmamados precocemente (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

### 2.2.1. *Escherichia coli*

Mundialmente, *E. coli* causa uma ampla gama de doenças em suínos, incluindo a diarreia neonatal (AND), diarreia pós-desmame (PWD), doença de edema (ED), poliserosite, mastite coliforme (CM) e infecção do trato urinário (UTI) (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005; FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

*E. coli* é uma bactéria Gram negativa, geralmente móvel devido a existência de flagelos peritríqueos, com comprimento variável e diâmetro de cerca de 1 µm. As colônias crescem em meio sólido dentro de 24 h após a incubação. Estas bactérias produzem colônias de cor rosa em ágar MacConkey, enquanto que algumas linhagens produzem colônias com brilho metálico quando crescem em ágar-eosina-azul de metileno, assim como também podem apresentar atividade hemolítica em ágar-sangue (QUINN et al., 2005; FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

*E. coli* faz parte da microbiota intestinal dos suínos. A colonização ocorre no início da vida. A patogenicidade da *E. coli* depende da sua virulência, isto é, fatores de colonização, enterotoxinas e endotoxinas (VAN BEERS-SCHREURS et al., 1992). A determinação sorológica se baseia em quatro tipos principais de antígenos: somático (O), capsular (K), flagelar (H) e fimbrial (F) (QUINN et al., 2005; FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

Existem várias maneiras de subdividir as espécies de *E. coli* em tipos, mas o melhor modo para classificar esta bactéria é por sorotipagem em associação com cepas virulentas. No entanto, apenas uma pequena porcentagem dos organismos são tipificáveis com base em antígenos O, K, H e F (QUINN et al., 2005; FAIRBROTHER; GYLES, 2012). A nomenclatura de *E. coli* patogênica evoluiu nos últimos anos, e o termo "patótipo" vem sendo usado para identificar tipos de *E. coli* com base em seu mecanismo de virulência. Este sistema pode identificar as diferentes classes de *E. coli* patogênicas, como *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* extraintestinal patogênica (ExPEC) (FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

### 2.2.2. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

ETEC é o mais importante patótipo responsável pela diarreia neonatal (AND), diarreia pós-desmame (PWD) e doença de edema (ED) em suínos (FAIRBROTHER;

NADEAU; GYLES, 2005; FAIRBROTHER; GYLES, 2012). ETEC também está presente nos intestinos de outras espécies animais e de humanos. Embora possa ser inofensiva, ETEC é considerada um dos patógenos mais comuns, causando problemas entéricos em viajantes e crianças em países em desenvolvimento (MOREDO et al., 2015).

ETEC é um patótipo que se caracteriza pela produção de adesinas que promovem a aderência bacteriana ao intestino, e de enterotoxinas que causam diarreia (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). As cepas de ETEC se aderem às microvilosidades do intestino delgado por meio de fímbrias, tais como F4, F5, F6, F18 e F41, que são codificadas pelos genes *faeG*, *fanC*, *fasA*, *fedA* e *F41*, e produzem enterotoxinas que atuam localmente em enterócitos (MOREDO et al., 2015). No entanto, as fímbrias F18 e F4 (K88) são os tipos mais comumente encontrados em PWD em suínos (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

As cepas com fímbrias F18 são tipicamente associadas à diarreia de leitões desmamados, enquanto as cepas com fímbrias F4 estão associadas a diarreia em leitões lactantes, assim como em leitões desmamados (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). O gene de uma adesina afimbrial chamada AIDA (adesina envolvida na aderência difusa) tem sido detectado em *E. coli* de leitões com PWD e ED (HA; CHOI; CHAE, 2003; NGELEKA et al., 2003). AIDA pode estar presente como a única adesina conhecida ou pode estar presente junto com F18 (NGELEKA et al., 2003). Outra proteína de superfície chamada Paa (gene associado A / E porcino) também tem sido sugerida como potencial adesina de EPEC e ETEC em PWD (BATAISSON et al., 2003)

Tanto a fimbria F18 como a fimbria F4 (K88) na PWD têm vários subtipos de variantes, com base em diferenças antigênicas. F4 (K88) apresenta duas variantes *ab* e *ac*, no entanto, quase todos pertencem ao F4*ac* (K88*ac*), e a maiorias das vezes são referidos simplesmente como F4 (K88). F18 tem duas variantes conhecidas, *ab* e *ac*. O F18*ac* é mais comumente associado com cepas de PWD, enquanto o F18*ab* está associado a cepas de ED (FAIRBROTHER; GYLES, 2012 ).

Com base na sua estabilidade térmica, as enterotoxinas ETEC são classificadas como toxinas termoelétricas (LT-I e LT-II), ou toxinas termostáticas (STa, STb e EAST1) (DUBREUIL, 2008). As toxinas LT aumentam a secreção de íons de sódio, cloreto, bicarbonato e água no lúmen, enquanto as toxinas ST reduzem a absorção de líquidos e sais (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005); em ambos os casos resultam em hipersecreção de água e eletrólitos no lúmen do intestino delgado que excede a capacidade de absorção do cólon, resultando este processo em diarreia, desidratação, redução da ingestão alimentar,

redução da digestibilidade dos nutrientes, redução do crescimento e até mesmo a morte (HEO et al., 2013).

Assim, os principais fatores de virulência do ETEC são as adesinas (principalmente apêndices chamados fimbriae ou pili) e enterotoxinas (proteínas ou peptídeos) (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005; NAGY; FEKETE, 2005). Além dos fatores de virulência adesivo e enterotóxico, a patogênese também envolve fatores do hospedeiro, os mais importantes dos quais são receptores para adesinas e para enterotoxinas (NAGY; FEKETE, 2005; DUAN; YAO; ZHU, 2012). A especificidade da espécie, que é uma característica geral das infecções de ETEC, é em grande parte devido à presença de receptores específicos (NAGY; FEKETE, 2005).

Os sorotipos específicos de *E. coli* que estão associados a PWD em suínos pertencem tipicamente aos sorogrupos O8, O138, O139, O141, O147, O149 e O157 (HEO et al., 2013); dos quais O149 parece ser o sorogrupo predominante (FRYDENDAHL, 2002; VU KHAC et al., 2006). Os resultados indicam que os isolados patogênicos de *E. coli* que produzem PWD pertencem a um número restrito de sorotipos e patótipos (VU KHAC et al., 2006).

### 2.2.3. Tratamento e Profilaxia

Na colibacilose pós-desmame o tratamento com antimicrobianos e eletrólitos deve ser administrado. Devido a uma ingestão de água e alimento restrita, os leitões devem ser tratados inicialmente por via parenteral; posteriormente, o antimicrobiano pode ser administrado via água ou ração (FAIRBROTHER; GYLES, 2012 ). A colistina é o antibiótico mais usado para o tratamento da PWD em suínos, e é principalmente utilizado em monoterapia, embora possa ser combinado com outros antimicrobianos, como a amoxicilina (RHOUMA et al., 2017). Um fluido de reidratação deve ser oferecido para conter a desidratação e a acidose, no caso de anorexia o fluido pode ser injetado intraperitonealmente (FAIRBROTHER; GYLES, 2012 ).

Medidas profiláticas como a vacinação e desinfecção do ambiente contribuem para diminuir a ocorrência de PWD (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). Entre tanto, as vacinas injetáveis, como as administradas às porcas para a prevenção da diarreia neonatal, estimulam principalmente a imunidade sistêmica e em menor proporção a imunidade da mucosa gastrointestinal, dando origem a anticorpos circulantes que não atingem bactérias intestinais em níveis suficientemente altos para serem muito efetivos (VAN DEN BROECK; COXA; GODDEERISAB, 1999).

Vacinas de *E. coli* avirulentas vivas e atenuadas de tipo selvagem parecem ser promissoras para o controle de infecções por ETEC (MELKEBEEK; GODDEERIS; COX, 2013). No entanto, o sucesso de uma vacina contra a PWD depende em grande parte da identificação do patótipo de ETEC mais prevalente presente na granja e da administração da vacina no momento ideal (NAGY; FEKETE, 2005).

A melhoria das condições de produção de suínos é uma medida crucial para reduzir a susceptibilidade dos animais a infecções microbianas e, conseqüentemente, reduzir o uso de antimicrobianos na produção animal (RHOUMA et al., 2016). Além disso, as práticas de manejo para os leitões desmamados devem minimizar as diferentes formas de estresse. Estas medidas incluem a prevenção da propagação da infecção, proporcionando aos suínos um bom conforto térmico (FAIRBROTHER; GYLES, 2012 ) e uma alimentação de alta qualidade (HEO et al., 2013).

A medicação preventiva no alimento é praticada frequentemente nos rebanhos afetados na maioria dos países, apesar das graves desvantagens como a seleção de bactérias resistentes, e também a falta de aceitação pelo consumidor (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). O desenvolvimento da resistência bacteriana contra uma ampla gama de medicamentos antimicrobianos torna a eficácia da terapêutica antimicrobiana incerta (FAIRBROTHER; GYLES, 2012 ).

### 2.3 COLISTINA

As polimixinas são um grupo de peptídeos policatiônicos naturalmente sintetizados pelo *Bacillus polymyxa*, representador pela colistina e a polimixina B (GALES; REIS; JONES, 2001). A colistina é um antimicrobiano polipeptídico derivado do *Bacillus polymyxa*, variedade *colistinus* (SUMANO; OCAMPO, 2006) e foi usada pela primeira vez no Japão em 1949 (KUMAZAWA; YAGISAWA, 2002). A colistina tem sido comercialmente disponível desde a década de 1950, mas foi amplamente substituída na década de 1970 devido à toxicidade potencial, em particular a nefrotoxicidade (YOUSEF et al., 2011).

A colistina também conhecida como polimixina E, apresenta-se eficiente contra vários patógenos Gram-negativos multirresistentes, em particular *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Proteus* spp (YOUSEF et al., 2011; TUNYAPANIT et al., 2013). Para estas espécies bacterianas, as polimixinas são às vezes os únicos antibióticos ativos disponíveis na medicina humana (BERGEN et al., 2012). A colistina atua principalmente na parede celular bacteriana Gram-negativa, levando a uma

rápida mudança na permeabilidade da membrana citoplasmática e, finalmente, à morte celular (GALES; REIS; JONES, 2001).

O sulfato de colistina (CS) tem sido utilizado na indústria pecuária em muitos países e é o tratamento recomendado para o tratamento de infecções do trato gastrointestinal, particularmente para aqueles causados pela família *Enterobacteriaceae* (RHOUMA et al., 2016). Em suínos, o CS é usado principalmente pela via oral na dose de 50.000 UI / kg, a cada 12 h, por um período de 5 dias consecutivos, para o tratamento de infecções intestinais causadas por *E. coli*. Este regime de drogas mostrou eficácia significativa no tratamento da diarreia por *E. coli* (GUYONNET et al., 2010).

Curiosamente, após décadas de uso de colistina na suinocultura, ao final do ano 2000 vários estudos começaram a relatar em suínos uma taxa de resistência significativa da família *Enterobacteriaceae* a este antibiótico (RHOUMA et al., 2016). As indústrias de suínos e aves, devido as regulamentações governamentais mais restritivas sobre o uso de antibióticos promotores de crescimento (AGP) na alimentação animal, estão avaliando ativamente soluções alternativas para excluir vários antibióticos das dietas animais (GIANNENAS et al., 2014; ZENG et al., 2015b). Com base em seu mecanismo de ação potencial, os ácidos orgânicos e os óleos essenciais (fitoterápicos) podem ser os tipos mais relevantes de aditivos para desenvolver uma estratégia de alimentação sem antibióticos (OMONIJO et al., 2017; ZHAI et al., 2018).

## 2.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos (AO) se diferenciam de outros ácidos por serem substâncias que possuem o grupo funcional COOH, na qual um grupo orgânico ou um átomo de hidrogênio podem estar ligados (FIORUCCI et al., 2002). Os nomes comumente usados para descrever este grupo de compostos orgânicos incluem ácidos gordurosos, voláteis gordurosos, lipofílicos, fracos, e por conter uma ou mais carboxilas também podem ser denominados ácidos carboxílicos (CHERRINGTON et al., 1991; BRAZ et al., 2011). A presença do grupo COOH atribui aos ácidos carboxílicos altos pontos de ebulição. Os ácidos carboxílicos de baixo peso molecular apresentam solubilidade apreciável em água, e à medida que o tamanho de cadeia aumenta a solubilidade em água diminui (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

Os AO estão presentes em células animais e vegetais, sendo constituintes naturais dos mesmos ou formados pelo processo de fermentação microbiana no trato gastrointestinal (GAUTHIER, 2002). Alguns AO, particularmente os ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, propionato e butirato, são produzidos em quantidades milimolares no

trato gastrointestinal de animais e humanos, apresentando-se em altas concentrações em regiões onde a microbiota anaeróbica é predominante (RICKE, 2003).

Os AO podem ser encontrados na forma livre e como sais de cálcio e potássio. A vantagem dos sais sobre os ácidos livres é que estes são geralmente inodoros e fáceis de manipular no processo de fabricação de alimentos devido a sua forma sólida e menor volatilidade. Eles também são menos corrosivos e podem ser mais solúveis em água do que os ácidos livres (PARTANEN; MROZ, 1999; GAUTHIER, 2002), destacando-se, neste sentido temos: o di-propionato de amônio, di-formato de potássio, formato de sódio, propionato de cálcio, lactato de cálcio, formato de amônio, etc (PAUL et al., 2007).

Os AO de cadeia linear saturados podem ser agrupados arbitrariamente de acordo com o seu comprimento de cadeia de carbono, ou seja, ácidos graxos de cadeia curta (1-6 átomos de carbono), ácidos graxos de cadeia média (7-10 carbonos) e ácidos graxos de cadeia longa (11 ou mais carbonos) (CHERRINGTON et al., 1991). Os nomes dos ácidos carboxílicos são obtidos pela retirada do sufixo -ano do nome do alcano equivalente, que corresponde à maior cadeia do ácido, e pela adição-óico precedida pela palavra ácido (CHERRINGTON et al., 1991; SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

#### 2.4.1. Usos dos Ácidos Orgânicos

Os AO têm sido utilizados ao longo da história como aditivos alimentares e conservantes para prevenir a deterioração dos alimentos e aumentar a vida útil dos ingredientes alimentares perecíveis (DANNER et al., 2003; RICKE, 2003). Na nutrição animal, são usados ácidos graxos de cadeia curta que produzem menor quantidade de prótons por molécula ao se dissociarem, e são conhecidos principalmente por apresentarem atividade antibacteriana (CHERRINGTON et al., 1991; SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015).

Além de servirem como uma fonte de energia para as células intestinais epiteliais (JÓZEFIAK; RUTKOWSKI; MARTIN, 2004), os AO apresentam efeitos fisiológicos positivos sobre a digestão ileal de proteínas e aminoácidos (MOSENTHIN et al., 1992), a absorção intestinal de minerais, a digestibilidade do fosfato (JONGBLOED et al., 2000), a secreção de enzimas endógenas e a morfologia intestinal (PARTANEN; MROZ, 1999). Entre os ácidos mais utilizados temos: o ácido fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico, málico, benzóico, sórbico, fumárico e cítrico, sendo os quatro últimos encontrados na forma sólida (PARTANEN; MROZ, 1999; GAUTHIER, 2002).

#### 2.4.2. Mecanismo de Ação Antimicrobiana dos Ácidos Orgânicos

A ação mais efetiva dos ácidos é provavelmente a atividade antimicrobiana, além da alteração indireta da microbiota intestinal mediante a produção de um meio favorável para bactérias lácticas (TSILOYIANNIS et al., 2001), que promovem benefícios ao organismo do animal e podem causar acidificação no lúmen intestinal (RISLEY et al., 1991; PARTANEN; MROZ, 1999). Embora os mecanismos antibacterianos dos AO não sejam totalmente compreendidos, eles são capazes de exibir propriedades bacteriostáticas e bactericidas dependendo do estado fisiológico do organismo e das características físico-químicas do ambiente externo (RICKE, 2003).

A ação antimicrobiana dos AO ocorre através de dois mecanismos: (1) redução do pH dos alimentos e do sistema digestório, criando um ambiente negativo para o crescimento de microrganismos patogênicos, especialmente do gênero *Escherichia*, *Salmonella* e *Clostridium* (DIBNER; BUTTIN, 2002; SILVA JUNIOR, 2009); e (2) o efeito antimicrobiano específico devido à forma não dissociada do ácido, que ao penetrar na célula bacteriana altera diversos processos essenciais para a vida de microrganismos (PARTANEN; MROZ, 1999; DAVIDSON; TAYLOR, 2007).

Os AO não dissociados são lipofílicos e podem difundir através das membranas celulares, incluindo as de bactérias. Uma vez dentro da célula, onde o pH é mantido próximo a 7, o ácido dissociará e suprimirá as enzimas celulares (descarboxilases e catalases) e sistemas de transporte de nutrientes (CHERRINGTON et al., 1991; DAVIDSON; TAYLOR, 2007), gerando um potencial problema para bactérias que devem manter o pH do citoplasma quase neutro para sustentar macromoléculas funcionais (DAVIDSON; TAYLOR, 2007). A dissociação de ácidos graxos aumenta à medida que os valores de pH se aproximam da neutralidade (CHERRINGTON et al., 1991). Tem-se a hipótese de que o acúmulo de ânions é o principal efeito tóxico dos AO, e que alguns organismos são mais resistentes aos AO porque são capazes de permitir que o seu pH interno diminua (RUSSELL, 1992).

O metabolismo microbiano é dependente da atividade enzimática, que é deprimida a um pH mais baixo (DIBNER; BUTTIN, 2002). Para corrigir o equilíbrio a célula é forçada a usar energia para expulsar prótons através da membrana por meio da bomba H<sup>+</sup>-ATPase, para restaurar o pH citoplasmático ao normal, o que contribuirá para a redução da disponibilidade de energia para a proliferação, resultando em algum grau de bacteriostase (DIBNER; BUTTIN, 2002; SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015).

A eficácia de um ácido na inibição de microrganismos depende do seu valor de pKa, que é o pH ao qual 50% do ácido é dissociado (PARTANEN; MROZ, 1999). Os ácidos orgânicos com maiores valores de pKa são conservantes mais eficazes e seu efeito antimicrobiano geralmente melhora com o aumento do comprimento da cadeia e do grau de insaturação (FOEGEDING; BUSTA, 1991). Quanto maior o valor de pKa, mais ionizado é o ácido e, conseqüentemente, maior é a sua força (CALVEYRA, 2010). Se o pH do lúmen for menor do que o pKa do ácido, a absorção será rápida, no entanto, o pH intestinal é normalmente superior ao pKa dos ácidos, fazendo que permaneçam na forma dissociada, que é pouco absorvida (CALVEYRA, 2010; GRECCO, 2014). Porém, as trocas dos íons de Na-H pelas células do epitélio intestinal provocam reduções locais do pH, levando a uma alteração para a forma iônica dos ácidos, resultando na absorção pela bactéria (CANIBE et al., 2001).

Outras atividades antibacterianas menos diretas também foram atribuídas aos AO e incluem a interferência no transporte de nutrientes, danos na membrana citoplasmática, que resultam na interrupção da permeabilidade da membrana externa, influenciando a síntese macromolecular (CHERRINGTON et al., 1991; ALAKOMI et al., 2000). Os mecanismos associados a essas atividades têm sido difíceis de estabelecer devido à natureza complexa da interação entre a dissipação de energia e a destruição das capacidades de geração de ATP das bactérias (RICKE, 2003). Por conseguinte, as concentrações bactericidas dos AO podem ser devidas à combinação da dissipação da força motora do próton e da incapacidade de manter o pH interno, seguido da desnaturação de proteínas e DNA sensíveis ao ácido (THOMPSON; HINTON, 1996).

A capacidade dos microrganismos para se adaptar e sobreviver a condições de baixo pH é essencial para a sua viabilidade em alimentos ácidos e / ou durante a passagem pelo ambiente ácido do estômago (BRUNO-BARCENA; AZCARATE-PERIL; HASSAN, 2010). Esta capacidade adaptativa é essencial para organismos benéficos e patogênicos. Desde a descoberta de que *E. coli* e *Salmonella typhimurium* poderiam se adaptar ao estresse de baixo pH, o fenômeno de tolerância induzida por ácido foi revelado em muitos microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos (FOSTER, 1999).

A exposição a condições ácidas moderadas (sub-letais) desencadeia uma resposta adaptativa, também chamada de resposta de tolerância a ácido (ATR), na qual as células ajustam a expressão de vários genes necessários para a sobrevivência no ambiente hostil de alto teor ácido (BRUNO-BARCENA; AZCARATE-PERIL; HASSAN, 2010). A maioria das bactérias ácido lácticas possui ATR, que melhora a sobrevivência de células adaptadas após

exposição a um desafio de ácido letal. A indução do ATR frequentemente protege as células não apenas do desafio com ácido, mas também de outros estresses (COTTER; HILL, 2003).

#### 2.4.3. Efeitos benéficos dos ácidos orgânicos em suínos

Vários estudos documentaram os efeitos dos AO puros ou suas misturas e/ou seus sais sobre o desempenho em suínos, principalmente em leitões depois do desmame (NAMKUNG et al., 2004; MANZANILLA et al., 2006; BRAZ et al., 2011). Porém, as respostas têm grandes variações, as quais se podem relacionar às diferenças no tipo e dosagem dos ácidos utilizados, composição da dieta basal e idade dos animais desmamados (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993; PARTANEN; MROZ, 1999).

O uso dos AO em dietas de leitões tem como objetivo principal diminuir a queda da taxa de crescimento que ocorre invariavelmente após o desmame e é frequentemente associada à ocorrência de diarreia (CHERRINGTON et al., 1991). Vários estudos indicaram que os AO auxiliam na digestão proteica e reduzem a população de coliformes no intestino em leitões, controlando assim a diarreia pos-desmame (GABERT; SAUER, 1995; PARTANEN; MROZ, 1999; TSILOYIANNIS et al., 2001).

Uma atividade chave dos AO é a redução do pH do estômago. Em meios com pH acima de 5,0, as bactérias patogênicas se proliferam com maior eficiência, enquanto que em meios com pH na faixa de 3,5 a 4,0 são as bactérias benéficas as que têm um melhor desenvolvimento (BLANCHARD, 2000). Então a redução do pH gástrico seleciona as bactérias benéficas para o organismo animal e inibe o crescimento de microrganismos patogênicos (VERSTEGEN; WILLIAMS, 2002).

Os acidificantes também têm influência sobre a secreção pancreática e biliar, e servem como substratos no metabolismo intermediário, contribuindo para melhorar a digestão, absorção e retenção de nutrientes da dieta (THAELA et al., 1998). Um outro mecanismo benéfico do AO no desempenho é pela estimulação direta da proliferação de células gastrointestinais (DIBNER; BUTTIN, 2002). Tem sido observado no intestino delgado em leitões jovens, um aumento da altura das vilosidades, área superficial e profundidade da cripta (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015; XU et al., 2018), o que também é acompanhado por uma maior produção de gastrina (SAKATA et al., 1995), aumentando assim a digestibilidade dos nutrientes.

#### 2.4.4. Características e Efeitos dos Ácidos Orgânicos Individuais

##### 2.4.4.1. Ácido fórmico

É um líquido incolor e transparente com um odor acre, corrosivo para metais e tecidos. O uso principal do ácido fórmico é como um agente conservante e antibacteriano na alimentação do gado (PARTANEN; MROZ, 1999). Tem sido utilizado na forma livre ou associado a sais de cálcio, sódio ou potássio, devido a maior facilidade de manejo e por ser menos volátil (KIL; KWON; KIM, 2011).

Em geral, a atividade antimicrobiana do ácido fórmico é principalmente contra as bactérias Gram-negativas (KRABBE, 2001). Diversos estudos realizados comprovam os efeitos benéficos do ácido fórmico no controle de microrganismos patogênicos como *E. coli* e *Salmonella* spp, diminuindo a incidência de diarreias (TSILOYIANNIS et al., 2001; KNARREBORG et al., 2002; CREUS et al., 2007).

Outros estudos evidenciaram melhoria no ganho de peso diário e na conversão alimentar de leitões alimentados após o desmame com dietas suplementadas com 0.6, 1.2, e 1.8 % de ácido fórmico livre, principalmente nas duas primeiras semanas do experimento (ECKEL et al., 1992; ROTH; KIRCHGESSNER, 1998). No entanto, Eckel et al. (1992) relataram que leitões alimentados com dietas contendo 2.4% de ácido fórmico apresentaram reduções significativas no ganho de peso e na conversão alimentar. Em outras pesquisas foram observadas reduções não significativas nestes parâmetros em leitões alimentados com dietas contendo 0.2-0.5 % de ácido fórmico (MANZANILLA et al., 2004; KIL et al., 2006).

O ácido fórmico comumente é utilizado nas rações combinado com o cálcio, resultando no formiato de cálcio, que é um constituinte natural dos tecidos e sangue dos animais (PARTANEN; MROZ, 1999). Semelhante ao que acontece com dietas com ácido fórmico livre, a adição de seus sais nas dietas de leitões produz efeitos contrastantes, tanto positivos (KLUGE; BROZ; EDER, 2006; LALLÈS et al., 2007; LI et al., 2008) como negativos (LAWLOR; LYNCH; CAFFREY, 2006; TORRALLARDONA et al., 2007) sobre o desempenho. Também é difícil concluir quais fontes de ácido fórmico tiveram o maior benefício na performance dos leitões desmamados (KIL; KWON; KIM, 2011).

Não foram observadas respostas claras dependentes da dose em suínos alimentados com dietas contendo ácido fórmico ou sais fórmicos. No entanto, a utilização de ácido fórmico deve ser moderada, pois o excesso de formiatos na dieta pode ocasionar

distúrbios no perfil ácido-base de suínos, gerando acidose metabólica, que resulta em diminuição do consumo e do crescimento (GIESTING; EASTER, 1991).

#### 2.4.4.2. Ácidos acético e propiônico

O ácido acético é um líquido incolor com um odor forte, é produzido através da oxidação de álcool por bactérias de gênero *Acetobacter* (PARTANEN; MROZ, 1999). O ácido propiônico é um líquido oleoso e tem desagradável odor rançoso. É produzido por *Propionibacterium* na fabricação de queijo, sendo também é um dos principais produtos finais da fermentação bacteriana (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015).

Roth e Kirchgessner (1988), utilizando 0.9, 1.8 e 2.7% de ácido acético em dietas para leitões entre o desmame e os 25 kg de peso vivo, verificaram melhora no ganho de peso e no consumo diário de ração, e também diminuição dos quadros de diarreia. A alimentação líquida fermentada para suínos foi benéfica para a saúde gastrointestinal dos animais, porém, os resultados de alguns estudos mostraram que a alta concentração de ácido acético na alimentação líquida fermentada tende a diminuir a ingestão alimentar, mas sem afetar significativamente o desempenho (BEAL et al., 2005; CANIBE; ØYAN PEDERSEN; BORG JENSEN, 2010). O ácido acético inibe o crescimento de muitas espécies de bactérias, como por exemplo a *E. coli* e a *Salmonella* spp; e tem um efeito menor sobre leveduras e fungos (PARTANEN; MROZ, 1999).

Estudos com leitões desmamados foram realizadas com inclusão do ácido propiônico nas rações, resultou em efeitos positivos no desempenho (ROTH; KIRCHGESSNER, 1998; TSILOYIANNIS et al., 2001). Giesting and Easter (1985) utilizaram dietas para leitões suplementadas com 2.0% de ácido propiônico e encontraram melhora significativa na eficiência alimentar, mas com a diminuição do ganho de peso e piora de conversão alimentar. O ácido propiônico tem um amplo espectro de ação contra os fungos e leveduras (PARTANEN; MROZ, 1999), além disso tem atividade antibacteriana contra *E. coli* e *Salmonella* spp. (TSILOYIANNIS et al., 2001; KNARREBORG et al., 2002).

#### 2.4.4.3. Ácido fumárico

O ácido fumárico é um ácido orgânico cristalino fraco sem odor. No suíno o ácido fumárico surge como um metabólito da degradação da fenilalanina e da tirosina, e

também aparece como intermediário no ciclo da ureia e durante a síntese de purina (PARTANEN; MROZ, 1999). Na nutrição suína pesquisadores do final do século XX estudaram intensamente o ácido fumárico em leitões desmamados (KIL; KWON; KIM, 2011). Sua ação antimicrobiana está orientada contra as bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. principalmente (TSILOYIANNIS et al., 2001; KNARREBORG et al., 2002).

Várias pesquisas com leitões desmamados foram realizadas com inclusão de 1.5-2.0% de ácido fumárico nas rações, com resultados positivos no desempenho e menor incidência de diarreia nas primeiras semanas após o desmame (KRAUSE; HARRISON; EASTER, 1994; TSILOYIANNIS et al., 2001; LAWLOR; LYNCH; CAFFREY, 2006). No entanto, em outros estudos com concentrações 0.2-1.5% de ácido fumárico na dieta leitões desmamados não foram observados efeitos positivos no desempenho {Formatting Citation}, mas houve menor incidência de diarreias (RIBEIRO et al., 2002).

#### 2.4.4.4. Ácido láctico

O ácido láctico é produzido por muitas espécies bacterianas, principalmente pelos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* (PARTANEN; MROZ, 1999). A ação antimicrobiana do ácido láctico é dirigida principalmente contra bactérias (*E. coli* e *Salmonella* spp.), sendo que muitos fungos e leveduras podem metabolizá-lo (CREUS et al., 2007).

Estudos evidenciaram melhoria no consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar e menor incidência de diarreia em leitões alimentados com dietas suplementadas com ácido láctico (TSILOYIANNIS et al., 2001; FREITAS et al., 2006; VALCHEV, 2008). Silva (2002) observou melhora significativa no ganho de peso médio diário em leitões suplementados com 2.5% do ácido láctico, mas não notou diferenças no consumo de ração e conversão alimentar em comparação ao tratamento controle. No entanto, Kil et al. (2006) não encontraram diferenças significativas no ganho de peso diário e na conversão alimentar com o uso de 0.2% ácido láctico na dieta de leitões durante as primeiras três semanas após o desmame.

#### 2.4.4.5. Ácido cítrico

O ácido cítrico é incolor e tem um sabor azedo agradável (PARTANEN; MROZ, 1999). É geralmente um agente antimicrobiano menos eficaz que outros ácidos orgânicos (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015), em parte porque muitos microrganismos podem metabolizá-lo e também devido ao baixo pKa (FOEGEDING; BUSTA, 1991). O ácido cítrico foi amplamente utilizado em experimentos na alimentação de suínos para melhorar o desempenho durante os anos de 1980 até 2000. Posteriormente, o uso do ácido cítrico chamou pouca atenção em relação aos leitões desmamados (KIL; KWON; KIM, 2011).

Trabalhos indicaram que, apesar da alta variação nos resultados, a inclusão de 1.5-3.0% de ácido cítrico na dieta geralmente aumentou o ganho do peso diário e a eficiência alimentar, mas diminuiu a ingestão diária média de alimento (RISLEY et al., 1991; RADCLIFFE; ZHANG; KORNEGAY, 1998; BOLING et al., 2000). Em estudos similares com leitões desmamados, houve melhoria no desempenho, incluindo a ingestão diária média de alimento (KRAUSE; HARRISON; EASTER, 1994; TSILOYIANNIS et al., 2001).

Outros estudos não evidenciaram melhoria no ganho de peso e na conversão alimentar de leitões alimentados com dietas suplementadas com ácido cítrico (RADECKI; JUHL; MILLER, 1988; GOTTLOB et al., 2005), houve até mesmo uma depressão destes parâmetros (EDMONDS; IZQUIERDO; BAKER, 1985).

#### 2.4.4.6. Outros ácidos

Uma série de outros AO como: málico, tartárico, sórbico, benzoico, caprílico e cáprico também têm sido estudados como acidificantes dietéticos para suínos (KIL; KWON; KIM, 2011). O ácido málico é encontrado naturalmente em maçãs e muitas outras frutas e é ativo contra certas bactérias e leveduras. O ácido tartárico, que é o ácido primário das uvas, tem um forte sabor ácido. O ácido sórbico está presente em certas bagas e tem um odor distinto e gosto azedo (PARTANEN; MROZ, 1999).

Leitões desmamados alimentados com dietas suplementadas com 0.5% de ácido benzoico apresentam melhora significativa do ganho de peso e da conversão alimentar na primeira ou segunda semana do tratamento (GUGGENBUHL et al., 2007; TORRALLARDONA; BADIOLA; BROZ, 2007; HALAS et al., 2010). Kirchgessner et al. (1995) observaram um aumento linear no ganho de peso, na conversão alimentar e na eficiência

de alimentação, aumentando a inclusão de 1.2 a 2.4% de ácido sórbico na dieta, independentemente do período experimental.

Dois estudos avaliaram os efeitos do ácido málico (1.2-2.5%) nas dietas de leitões desmamados; nenhum efeito sobre o ganho de peso, consumo diário de alimento e eficiência alimentar na primeira e segunda semana dos experimentos. Entre tanto, em ambos uma melhora significativa da eficiência alimentar foi observada considerando o período do desmame até a fase de finalização. Este resultado provavelmente está relacionado a diminuição do consumo diário do alimento que foi observado ao longo dos experimentos (KIRCHGESSNER et al., 1993; KRAUSE; HARRISON; EASTER, 1994). Dentro dos níveis de dose utilizados, com a inclusão de 2.4%, o ácido mostrou as melhores respostas de desempenho e pode ser considerada como a dose ideal.

Estudo testou inclusão de 0.1-0.2% de ácido caprílico e cáprico na dieta de leitões encontrando uma melhoria no desempenho, especialmente em animais que receberam alimentação com ácido caprílico. Os ácidos também reduziram a mortalidade dos leitões, enquanto aumentaram significativamente a digestibilidade das proteínas e, em menor grau, também a digestibilidade das fibras. Além disso, a inclusão de ácido cáprico resultou em um aumento significativo na altura das vilosidades e na profundidade da criptas, comparadas ao grupo controle (HANCZAKOWSKA; SZEWCZYK; OKOŃ, 2011).

#### 2.4.5. Fatores que Afetam a Eficácia dos Ácidos Orgânicos

Os resultados das respostas dos leitões desmamados aos AO mostram variações consideráveis. Alguns autores relataram que os leitões desmamados apresentaram melhorias na saúde e no desempenho, enquanto outros não encontraram efeito ou obtiveram resultados negativos (TSILOYIANNIS et al., 2001; KIL et al., 2006; TORRALLARDONA; BADIOLA; BROZ, 2007) .

Esses resultados contraditórios entre os experimentos são principalmente devido a grandes variações nas metodologias experimentais, como as idades dos animais, tipo e dose de ácido utilizado e composição da dieta basal (ALMEIDA; RIGOBELLO; MARIN, 2007; KIL; KWON; KIM, 2011).

Em geral os suínos mais jovens apresentaram maiores melhorias que os suínos mais velhos, em especial por que o sistema digestório destes animais amadurecem com a idade (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993). Além disso, as dietas complexas contêm

ingredientes mais digeríveis que dietas simples, o que também pode diminuir os impactos positivos dos ácidos orgânicos (PARTANEN; MROZ, 1999).

Também é sugerido que dietas simples que contenham principalmente cereais e farinha de vegetais possam beneficiar aos leitões desmamados em maior grau que as dietas complexas, que contêm produtos lácteos, pois os produtos lácteos podem mascarar os efeitos positivos dos acidificantes em leitões (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993; KIL; KWON; KIM, 2011).

## 2.5 EXTRATOS VEGETAIS: ADITIVOS FITOGÊNICOS

As plantas produzem um grande número de metabólitos secundários ou fitoquímicos, que são importantes para a fisiologia vegetal. As plantas usam a maioria desses compostos como um mecanismo de defesa contra microrganismos e outros predadores (SULTANBAWA, 2011). Óleos essenciais, terpenóides, compostos fenólicos, polipeptídios, alcaloides e poliacetilenos são os principais fitoquímicos presentes nas plantas (COWAN, 1999).

Os aditivos alimentares fitogênicos são produtos derivados de plantas utilizados na alimentação animal para melhorar o desempenho. Uma grande variedade de compostos fitogênicos podem ser classificados de acordo com sua origem (ervas e especiarias) e processamento (óleos essenciais e oleorresinas), sendo os principais os óleos essenciais (WINDISCH et al., 2008).

Os aditivos alimentares fitogênicos podem ser incluídos entre os suplementos que visam afetar positivamente a qualidade dos alimentos, a saúde dos animais, bem como os produtos animais, por meio de seus princípios ativos especificamente eficazes (KARÁSKOVÁ; SUCHÝ; STRAKOVÁ, 2016). O uso de aditivos fitogênicos na ração de animais de produção tem sido interesse crescente para inclusão em alimentos para animais, principalmente como substituto de antibióticos promotores de crescimento (LÜCKSTÄDT; JONES; NIES, 2005).

### 2.5.1. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OE) ou também chamados óleos voláteis ou etéreos são líquidos oleosos aromáticos, obtidos a partir de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Podem ser obtidos por diversos processos, mas o método de destilação a vapor é o mais comumente usado para produção comercial destes

compostos (BURT, 2004). Os OE constituem o que é chamado de "essência" de uma planta e geralmente têm fragrâncias agradavelmente perfumadas (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Cerca de 3000 OE são conhecidos, dos quais cerca de 300 são comercialmente importantes e destinados principalmente ao mercado de sabores e fragrâncias (VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1999).

Os principais componentes ativos antimicrobianos dos OE são fenóis, terpenos e aldeídos (CEYLAN; FUNG, 2004), mas os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas dos EO (COSENTINO et al., 1999). Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes em OE, é provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico (BENTO et al., 2013). Estudos "*in vitro*" também sugerem que a combinação de OE tem um efeito antibacteriano maior do que os OE individualmente, indicando uma ação sinérgica desta associação (BURT, 2004).

Uma característica importante dos OE e de seus componentes é a sua hidrofobicidade, o que lhes permite interagir com os lipídios da membrana celular bacteriana e das mitocôndrias, comprometendo sua integridade e função, tornando-as mais permeáveis e edemaciadas (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994; BENTO et al., 2013). Essas alterações resultam em inibição das enzimas respiratórias e dissipação parcial do gradiente de pH e potencial elétrico, mais o esgotamento do grupo ATP, o que acabará por levar à morte celular (DI PASQUA et al., 2007)

Comumente os OE que contêm uma alta porcentagem de compostos fenólicos, como o carvacrol, eugenol e timol, possuem as propriedades antibacterianas mais fortes contra os agentes patogênicos transmitidos por alimentos (LAMBERT et al., 2001). A composição de OE de uma determinada espécie de planta pode variar entre as estações de colheita e entre fontes geográficas (CEYLAN; FUNG, 2004). Geralmente, os OE produzidos a partir de ervas colhidas durante ou imediatamente após a floração possuem a maior atividade antimicrobiana (MARINO; BERSANI; COMI, 1999). A composição de OE de diferentes partes da mesma planta também pode apresentar variações consideráveis (DELAQUIS, 2002).

O carvacrol é um dos principais componentes dos óleos de orégano e tomilho, e o timol é estruturalmente muito parecido ao carvacrol, tendo o grupo hidroxilo em um local diferente no anel fenólico (LAMBERT et al., 2001; BURT, 2004). Ambas as substâncias parecem tornar a membrana celular bacteriana permeável (LAMBERT et al., 2001). São capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, liberando

lipopolisacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática para ATP (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; BURT, 2004).

Dentro do grupo dos óleos, o carvacrol e o timol apresentam uma grande perspectiva de substituir os antibióticos. Desses, o mais efetivo é o carvacrol, que atua em leveduras, fungos e microrganismos Gram positivos e Gram negativos, com amplo espectro antibacteriano (SUZUKI; ELIAS; SILVA, 2008). Vários estudos em sistemas de modelos de cultura revelaram a atividade bacteriostática ou bactericida do carvacrol e do timol em agentes patogênicos como: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (COSENTINO et al., 1999; LAMBERT et al., 2001; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

O eugenol é um componente principal (aproximadamente 85-90%) do óleo de cravo (SURBURG; PANTEN, 2006). Estudos mostraram suas propriedades antimicrobianas tanto como bacteriostático como bactericida sobre *S. typhimurium*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* e *Campylobacter jejuni* (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

O carvona é produzido principalmente por extração e purificação de óleos essenciais de sementes de alcaravia, aneto e hortelã (SURBURG; PANTEN, 2006). Estudo afirma que a taxa de crescimento específico de *E. coli*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* diminui com o aumento das concentrações de carvona (OOSTERHAVEN; POOLMAN; SMID, 1995). Porém, um outro estudo desmostrou que o carvona era ineficaz na membrana externa de *E. coli* e *S. typhimurium* (HELANDER et al., 1998).

O cinamaldeído é o principal componente do óleo de cássia ou canela-chinesa (aproximadamente 90%) e do óleo da casca de canela do Sri Lanka (aproximadamente 75%), e na natureza, o isômero trans é predominante (SURBURG; PANTEN, 2006). O cinamaldeído é conhecido por ser inibidor do crescimento de *E. coli* e *S. typhimurium* em concentrações semelhantes ao carvacrol e timol (HELANDER et al., 1998). Vários estudos que avaliaram a atividade antibacteriana dos OE ou de seus componentes em alimentos demonstraram que o óleo de canela é um agente antibacteriano eficaz contra *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Pseudomonas putida* e *Salmonella* spp. (BAYOUMI, 1992; OUATTARA; SABATO; LACROIX, 2001; WEISSINGER; MCWATTERS; BEUCHAT, 2001).

A maioria dos estudos que pesquisam a ação dos OE contra microrganismos decompositores de alimentos e patógenos concordam que geralmente as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a ação dos OE que as bactérias Gram-negativas (JULIANO; MATTANA; USAI, 2000; LAMBERT et al., 2001; DELAQUIS, 2002). Quanto aos

microrganismos Gram-negativos, espera-se que estes sejam menos suscetíveis à ação de antibacterianos, pois possuem uma membrana externa que envolve a parede celular, o que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da cobertura de lipopolissacarídeos (BEN HSOUNA et al., 2017). Pelo contrário, aproximadamente 90-95% das paredes celulares das bactérias Gram-positivas são compostas por peptidoglicano, o que permite facilmente a entrada de moléculas hidrofóbicas nas células (NAZZARO et al., 2013).

Na suinocultura, considerando que as recentes limitações do uso de antibióticos agravam os desafios para o leitão durante o período crítico após o desmame (MICHIELS et al., 2010), muitas estratégias foram desenvolvidas para melhorar a saúde intestinal e o desempenho de leitões recém-desmamados. Os produtos baseados em OE e extratos de plantas estão entre as opções mais interessantes para a substituição da AGP (MICHIELS et al., 2010; LI et al., 2012).

Os OE foram cientificamente reconhecidos como aditivos para o desenvolvimento de potenciadores do crescimento para os leitões desmamados (FRANKIČ et al., 2009; FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010; ZENG et al., 2015b). Em outros estudos onde foram testadas dietas de leitões recém desmamados suplementadas com OE, foi verificado que a digestibilidade da matéria seca, da proteína bruta e da energia aumentou nos tratamentos com extratos vegetais em relação aos animais controles (OETTING et al., 2006; ZENG et al., 2015a).

Em suíno, estudos investigaram o efeito de complementos dietéticos na morfologia intestinal (proliferação, profundidade de criptas, altura de vilosidades, proporção de altura das vilosidades: profundidade da cripta) como um indicativo de saúde animal (BRUNSGAARD, 1998; JIANG et al., 2000; WHITE et al., 2002). No entanto, a literatura apresenta resultados discordantes quanto ao uso de OE como aditivos para melhora da morfologia intestinal. Existem estudos *in vivo*, que mostram tanto aumento como redução na altura das vilosidades e na profundidade das criptas no jejuno e no cólon de leitões alimentados com OE (MANZANILLA et al., 2006; LI et al., 2012; ZENG et al., 2015a).

Alguns estudos com leitões desmamados suplementados com diferentes combinações de OE, apresentaram efeitos variáveis sobre o desempenho e a atividade antimicrobiana (ZHANG et al., 2012; MELO et al., 2014; CAIRO et al., 2018). Isso pode estar relacionado às diferentes concentrações dos componentes ativos dos produtos testados, bem como a sua estabilidade na alimentação e/ou no trato digestório, do mesmo modo, a evaporação do produto na alimentação também pode contribuir para a diferença no seu efeito biológico (LI et al., 2012).

Além disso, foi demonstrado que os OE durante o período de crescimento têm maior eficácia que no período de terminação sobre os parâmetros de desempenho (YAN et al., 2010). Esta menor eficácia durante este período pode estar relacionada ao sistema digestório mais desenvolvido, imunidade eficiente e maior resistência aos distúrbios intestinais (LI et al., 2012).

Finalmente, pelo fato de serem hidrofóbicos, alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana dos OE pode ser difícil de observar quando são testados “*in vivo*” porque são absorvidos rapidamente pelo animal (KOHLERT et al., 2000; MICHIELS et al., 2008; DE LANGE et al., 2010). É provável que a absorção rápida dos óleos reduza tanto suas concentrações no lúmen, como o contato entre o óleo e as células bacterianas, diminuindo conseqüentemente sua eficácia. Essas observações sugerem que os OE precisam de proteção para agirem nas partes finais do GIT para exercer sua atividade antimicrobiana (DE LANGE et al., 2010). A microencapsulação pode ser uma alternativa importante para se atingir este objetivo (DE LANGE et al., 2010; LI et al., 2012).

Os OE, além dos efeitos antibacterianos, apresentam outros efeitos benéficos específicos como: antifúngicos (HSU; CHANG; CHANG, 2007; CHENG et al., 2008), antivirais (BISHOP, 1995; GARCÍA et al., 2003), antitoxigênicos (ULTEE; SMID, 2001; JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002) antiparasitários (REMMAL et al., 2011) , antioxidantes (VIUDA-MARTOS et al., 2010; AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013), e propriedades inseticidas e repelentes (KORDALI et al., 2008; BENTO et al., 2013).

## 2.6 COMBINAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

As misturas sinérgicas de antimicrobianos são muito procuradas, não só por uma possível faixa espectral mais ampla, mas também por apresentar menor toxicidade e custos (AKŞIT et al., 2006). Existe um interesse crescente de investigar o potencial sinérgico ou efeito aditivo da combinação de OE com outros aditivos alimentares, incluindo ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos e enzimas, particularmente nos ensaios de alimentação sem AGP (BOZKURT et al., 2012).

Existem vários estudos demonstrando os efeitos antibacterianos de aditivos a base de OE e AO, especialmente sobre as bactérias Gram negativos (SOUZA et al., 2009; HULÁNKOVÁ; BOŘILOVÁ, 2011). Os mecanismos do efeito antimicrobiano sinérgico da combinação de OE e AO ainda não são claros. No entanto, é bem conhecido que os fenóis no OE podem comprometer a permeabilidade da membrana celular bacteriana, aumentando assim

a susceptibilidade das bactérias aos ácidos orgânicos, levando à morte da bactéria (OMONIJO et al., 2017; XU et al., 2018). Além disso, a hidrofobicidade de um óleo essencial é aumentada em pH baixo, permitindo a passagem mais fácil através dos lipídios da membrana celular bacteriana (OMONIJO et al., 2017).

Estudos recentes indicam que a adição de uma combinação de AO e OE na dieta de leitões desmamados proporciona um possível efeito sinérgico, especialmente no desempenho produtivo (CHO; KIM, 2015; XU et al., 2018). Ou seja, OE e os AO proporcionam mais benefícios quando combinados que quando administrados individualmente (BOZKURT et al., 2012). No entanto, este efeito sinérgico sobre a saúde intestinal não é maior do que quando fornecida individualmente (XU et al., 2018).

Além disso as misturas de OE e AO são geralmente reconhecidas como seguras, sendo completamente biodegradáveis e não deixando resíduos. Portanto, não requerem tempo de retirada, assim como também apresentam fácil preparo ao longo da cadeia produtiva de alimentos para animais (LÜCKSTÄDT; JONES; NIES, 2005).

## REFERÊNCIAS

AKŞIT, M.; GÖKSOY, E.; KÖK, F.; ÖZDEMİR, D.; ÖZDO AN, M. The impacts of organic acid and essential oil supplementations to diets on the microbiological quality of chicken carcasses. **Archiv Für Geflügelkunde**, v. 70, n. 4, p. 168–173, 2006.

ALAKOMI, H. L.; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001–5, 2000.

ALMEIDA, F.; RIGOBELLO, E.; MARIN, J. Diarréia Suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **ARS Veterinaria**, v. 23, n. 3, p. 151–157, 2007.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835–10847, 2013.

ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of diarrhea. In: ANDERSON, N.V. **Veterinary Gastroenterology**. 2nd. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.163-172, 1992.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; SHINYA, L. T.; DOTTO, D. S. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 225–229, 2003.

BAILEY, M.; HAVERSON, K.; INMAN, C.; HARRIS, C.; JONES, P.; CORFIELD, G.; MILLER, B.; STOKES, C. The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. **The Proceedings of the Nutrition**

**Society**, v. 64, n. 4, p. 451–7, 2005.

BATISSON, I.; GUIMOND, M.-P.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J. M.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516–25, 2003.

BAYOUMI, S. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yoghurt. **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**, v. 14, n. 1–2, p. 21–26, 1992.

BEAL, J. D.; NIVEN, S. J.; BROOKS, P. H.; GILL, B. P. Variation in short chain fatty acid and ethanol concentration resulting from the natural fermentation of wheat and barley for inclusion in liquid diets for pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 3, p. 433–440, 2005.

BEN HSOUNA, A.; BEN HALIMA, N.; SMAOUI, S.; HAMDI, N. Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 146, 2017.

BENTO, M. H. L.; OUWEHAND, A. C.; TIIHONEN, K.; LAHTINEN, S.; NURMINEN, P. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals – Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. **Veterinárni Medicína**, v. 2013, n. 9, p. 449–458, 2013.

BERGEN, P. J.; LANDERSDORFER, C. B.; ZHANG, J.; ZHAO, M.; LEE, H. J.; NATION, R. L.; LI, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ‘old’ polymyxins: what is new? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 3, p. 213–223, 2012.

BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden amp; Betche) Cheel (Tea Tree) against Tobacco Mosaic Virus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 641–644, 1995.

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

BOLING, S. D.; WEBEL, D. M.; MAVROMICHALIS, I.; PARSONS, C. M.; BAKER, D. H. The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 682–9, 2000.

BOUDRY, G.; PÉRON, V.; LE HUËROU-LURON, I.; LALLÈS, J. P.; SÈVE, B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 9, p. 2256–62, 2004.

BOZKURT, M.; KÜÇÜKYILMAZ, K.; ÇATLI, A.; ÇINAR, M.; ÇABUK, M.; ALÇIÇEK, A. Effects of administering an essential oil mixture and an organic acid blend separately and combined to diets on broiler performance. **Archiv für Geflügelkunde**, v. 2, p. 81–87, 2012.

BRAZ, D. B.; COSTA, L. B.; BERENCHTEIN, B.; TSE, M. L. P.; ALMEIDA, V. V.; MIYADA, V. S. Acidificantes como alternativa aos antimicrobianos promotores do

crescimento de leitões. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 231, p. 745–756, 2011.

BRITO, B. G. de; FILIPPSEN, L. F.; MORES, N. Estudo ecopatológico da diarreia pós-desmame em granjas suinícolas do sudoeste do Paraná. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 431–436, 1995.

BRUNO-BARCENA, J. M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; HASSAN, H. M. Role of Antioxidant Enzymes in Bacterial Resistance to Organic Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2747–2753, 2010.

BRUNSGAARD, G. Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 11, p. 2787–98, 1998.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CAIRO, P. L. G.; GOIS, F. D.; SBARDELLA, M.; SILVEIRA, H.; DE OLIVEIRA, R. M.; ALLAMAN, I. B.; CANTARELLI, V. S.; COSTA, L. B. 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**, v. 98, n. 2, p. 541–548, 2018.

CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19, 2013.

CALVEYRA, J. C. **Efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico na dieta sobre a excreção de *Salmonella Typhimurium* em suínos em fase de crescimento e terminação infectados experimentalmente**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CANIBE, N.; ENGBERG, R.M.; JENSES, B.B. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. In: PROCEEDINGS OF THE WORKSHOP ON ALTERNATIVES TO FEED ANTIBIOTICS AND ANTICOCCIDIALS IN THE PIG AND POULTRY MEAT PRODUCTION, GUT ENVIRONMENT AND FEED ADDITIVES, 2001, Oslo-Norway. **Anais...** Oslo, 2001.

CANIBE, N.; ØYAN PEDERSEN, A.; BORG JENSEN, B. Impact of acetic acid concentration of fermented liquid feed on growth performance of piglets. **Livestock Science**, v. 133, n. 1–3, p. 117–119, 2010.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1–55, 2004.

CHAMONE, J. M. A.; DE MELO, M. T. P.; AROUCA, C. L. C.; BARBOSA, M. M.; DE SOUZA, F. A.; DOS SANTOS, D. Fisiologia digestiva de leitões. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 7, n. 5, p. 1353–1363, 2010.

CHENG, S.-S.; LIU, J.-Y.; CHANG, E.-H.; CHANG, S.-T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, v.

99, n. 11, p. 5145–5149, 2008.

CHERRINGTON, C. a; HINTON, M.; MEAD, G. C.; CHOPRA, I. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 32, n. Table 1, p. 87–108, 1991.

CHO, J.; KIM, I. Effects of microencapsulated organic acids and essential oils on growth performance and intestinal flora in weanling pigs. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 28, n. 3, p. 229–237, 2015.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130–5, 1999.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 67, n. 3, p. 429–53, table of contents, 2003.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–82, 1999.

CRANWELL, P. D. The development of acid and pepsin (EC 3.4.23.1) secretory capacity in the pig; the effects of age and weaning. 1. Studies in anaesthetized pigs. **The British Journal of Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 305–20, 1985.

CREUS, E.; PÉREZ, J. F.; PERALTA, B.; BAUCCELLS, F.; MATEU, E. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, n. 8, p. 314–319, 2007.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 562–7, 2003.

DAVIDSON, P. M.; TAYLOR, T. M. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L. (ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3rd ed. Washington DC: ASM Press, p.713–745, 2007.

DE LANGE, C. F. M.; PLUSKE, J.; GONG, J.; NYACHOTI, C. M. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**, v. 134, n. 1–3, p. 124–134, 2010.

DELAQUIS, P. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 101–109, 2002.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863–4870, 2007.

DIAO, H.; ZHENG, P.; YU, B.; HE, J.; MAO, X. B.; YU, J.; CHEN, D. W. Effects of dietary

supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. **Livestock Science**, v. 167, p. 249–256, 2014.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism<sup>1</sup>. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453–463, 2002.

DUAN, Q.; YAO, F.; ZHU, G. Major virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 7–14, 2012.

DUBREUIL, J. D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 2, p. 137–145, 2008.

ECKEL, B.; KIRCHGEBNER, M.; ROTH, F.X. Influence of formic acid on daily weight-gain, feed-intake, feed conversion rate and digestibility. Communication investigations about the nutritive efficacy of organic-acids in the rearing of piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 67, p. 93–100, 1992.

EDMONDS, M. S.; IZQUIERDO, O. A.; BAKER, D. H. Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 462–9, 1985.

FAIRBROTHER J.M.; GYLES C. L. Colibacillosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W. (eds). **Diseases of Swine**. 10th. ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, p. 723–749, 2012.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, É.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 01, p. 17–39, 2005.

FIORUCCI, A. R.; HERBERT, M.; BARBOSA, F.; TADEU, É.; CAVALHEIRO, G. Alguns ácidos orgânicos do nosso cotidiano. **Química Nova na Escola**, p. 6–10, 2002.

FOEGEDING, P. M.; BUSTA, F. F. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 4th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 802–832, 1991.

FOSTER, J. W. When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 170–174, 1999.

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

FRANKIČ, T.; VOLJČ, M.; SALOBIR, J.; REZAR, V. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 94, n. 2, p. 95–102, 2009.

FRANZ, C.; BASER, K.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 327–340, 2010.

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

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 169–82, 2002.

GABERT, V. M.; SAUER, W. C. The effect of fumaric acid and sodium fumarate supplementation to diets for weanling pigs on amino acid digestibility and volatile fatty acid concentrations in ileal digesta. **Animal Feed Science and Technology**, v. 53, n. 3–4, p. 243–254, 1995.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for Polymyxin B and Colistin: review of available Interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183–190, 2001.

GARCÍA, C. C.; TALARICO, L.; ALMEIDA, N.; COLOMBRES, S.; DUSCHATZKY, C.; DAMONTE, E. B. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1073–1075, 2003.

GAUTHIER, R. The mode of action of acidifiers and the interest they generate in the growing-finishing phase. In: CURRENT DEVELOPMENTS IN PIG PRODUCTION, 2002, Maison-Alfort. **Anais... Maisons-Alfort**, 2002.

GIANNENAS, I.; PAPANEOPHYTOU, C. P.; TSALIE, E.; PAPPAS, I.; TRIANTAFILLOU, E.; TONTIS, D.; KONTOPIDIS, G. A. Dietary supplementation of benzoic acid and essential oil compounds affects buffering capacity of the feeds, performance of turkey poults and their antioxidant status, pH in the digestive tract, intestinal microbiota and morphology. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 225–236, 2014.

GIESTING, D. W.; EASTER, R. A. Response of starter pigs to supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 5, p. 1288–94, 1985.

GIESTING, D. W.; EASTER, R. A. Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 6, p. 2497, 1991.

GONG, J.; YU, H.; LIU, T.; LI, M.; SI, W.; DE LANGE, C. F. M.; DEWEY, C. Characterization of ileal bacterial microbiota in newly-weaned pigs in response to feeding lincomycin, organic acids or herbal extract. **Livestock Science**, v. 116, n. 1–3, p. 318–322, 2008.

GOTTLOB, R. O.; GROESBECK, C. N.; TOKACH, M. D.; DRITZ, S. S.; GOODBAND, R. D.; DEROUCHÉY, J. M.; NELSEN, J. L.; NEILL, C. R. Effects of water-based citric acid on growth performance and water disappearance of weanling pigs. **Swine Research**, p. 60–63, 2005.

GRECCO, T. H. **Acidificantes em dietas de leitões desmamados: desempenho, peso de órgãos, pH, morfometria e microbiota intestinal**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2014.

GUGGENBUHL, P.; SÉON, A.; QUINTANA, A. P.; NUNES, C. S. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. **Livestock Science**, v. 108, n. 1–3, p. 218–221, 2007.

GUYONNET, J.; MANCO, B.; BADUEL, L.; KALTSATOS, V.; ALIABADI, M. H. F. S.; LEES, P. Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 307–314, 2010.

HA, S.-K.; CHOI, C.; CHAE, C. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 4, p. 378–381, 2003.

HALAS, D.; HANSEN, C. F.; HAMPSON, D. J.; MULLAN, B. P.; KIM, J. C.; WILSON, R. H.; PLUSKE, J. R. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, n. 3–4, p. 137–147, 2010.

HALAS, D.; HANSEN, C. F.; HAMPSON, D. J.; MULLAN, B. P.; WILSON, R. H.; PLUSKE, J. R. Effect of dietary supplementation with inulin and/or benzoic acid on the incidence and severity of post-weaning diarrhoea in weaner pigs after experimental challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Archives of Animal Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 267–280, 2009.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985–990, 1 jun. 1999.

HAMPSON, D. J. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. **Research in Veterinary Science**, v. 40, n. 1, p. 32–40, 1986.

HANCZAKOWSKA, E.; SZEWCZYK, A.; OKOŃ, K. Effects of dietary caprylic and capric acids on piglet performance and mucosal epithelium structure of the ileum. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 20, n. 4, p. 556–565, 2011.

HEDEMANN, M. S.; JENSEN, B. B. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 47–59, 2004.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590–3595, 1998.

HEO, J. M.; OPAPEJU, F. O.; PLUSKE, J. R.; KIM, J. C.; HAMPSON, D. J.; NYACHOTI, C. M. 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.

HESS, R. G.; BACHMANN, P. A. Distribution of antibodies to rotavirus in serum and lacteal secretions of naturally infected swine and their suckling pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 7, p. 1149–52, 1981.

HOLLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 345–375, 1990.

HSU, F.; CHANG, H.; CHANG, S. Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 734–738, 2007.

HULÁNKOVÁ, R.; BOŘILOVÁ, G. *In vitro* combined effect of oregano essential oil and caprylic acid against *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, n. 4, p. 343–348, 2011.

JENSEN, M. S.; JENSEN, S. K.; JAKOBSEN, K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 2, p. 437–45, 1997.

JIANG, R.; CHANG, X.; STOLL, B.; FAN, M. Z.; ARTHINGTON, J.; WEAVER, E.; CAMPBELL, J.; BURRIN, D. G. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 1, p. 21–6, 2000.

JONGBLOED, A. .; MROZ, Z.; VAN DER WEIJ-JONGBLOED, R.; KEMME, P. . The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. **Livestock Production Science**, v. 67, n. 1–2, p. 113–122, 2000.

JÓZEFIK, D.; RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S. . Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 113, n. 1–4, p. 1–15, 2004.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 683–7, 2002.

JULIANO, C.; MATTANA, A.; USAI, M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 4, p. 516–522, 2000.

KARÁSKOVÁ, K.; SUCHÝ, P.; STRAKOVÁ, E. Current use of phytogetic feed additives in animal nutrition: a review. **Czech Journal of Animal Science**, v. 60, n. No. 12, p. 521–530, 2016.

KELLY, D.; SMYTH, J. A.; MCCRACKEN, K. J. Digestive development of the early-weaned pig. 2. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. **The British Journal of Nutrition**, v. 65, n. 2, p. 181–8, 1991.

KEMPF, I.; FLEURY, M. A.; DRIDER, D.; BRUNEAU, M.; SANDERS, P.; CHAUVIN, C.; MADEC, J.-Y.; JOUY, E. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.

42, n. 5, p. 379–383, 2013.

KHAN, A. R.; KHAZANOVICH-BERNSTEIN, N.; BERGMANN, E. M.; JAMES, M. N. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 10968–75, 1999.

KIL, D. Y. .; KWON, W. B. .; KIM, B. G. Dietary acidifiers in weanling pig diets: A review. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 24, p. 231–247, 2011.

KIL, D. Y.; PIAO, L. G.; LONG, H. F.; LIM, J. S.; YUN, M. S.; KONG, C. S.; JU, W. S.; LEE, H. B.; KIM, Y. Y. Effects of organic or inorganic acid supplementation on growth performance, nutrient digestibility and white blood cell counts in weanling pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 2, p. 252–261, 2006.

KIRCHGESSNER M, ROTH FX, EIDELSBURGER U. Nutritive value of tartaric and malic acids in piglet rearing. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 70, p. 216–224, 1993.

KIRCHGESSNER M, ROTH FX, PAULICKS BR. Nutritive value of sorbic acid in piglet rearing. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 74, p. 235–242, 1995.

KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 7–8, p. 316–324, 2006.

KNARREBORG, A.; MIQUEL, N.; GRANLI, T.; JENSEN, B. B. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 99, n. 1–4, p. 131–140, 2002.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MÄRZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E. U.; VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, v. 66, n. 6, p. 495–505, ago. 2000.

KONSTANTINOV, S. R.; FAVIER, C. F.; ZHU, W. Y.; WILLIAMS, B. A.; KLÜSS, J.; SOUFFRANT, W.-B.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L.; SMIDT, H. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. **Animal Research**, v. 53, n. 4, p. 317–324, 2004.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8788–8795, 2008.

KRABBE, E. L. Alternativas aos promotores de crescimento convencionais – Potencial e viabilidade. In: PRÉ SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: AVES E SUÍNOS, 2001, Santa Maria. **Anais...** Concordia: Embrapa Suíno e Aves, p. 61-69, 2001.

KRAUSE, D. O.; HARRISON, P. C.; EASTER, R. A. Characterization of the nutritional interactions between organic acids and inorganic. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 5, p. 1257–62, 1994.

KUMAZAWA, J.; YAGISAWA, M. The history of antibiotics: The Japanese story. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 8, n. 2, p. 125–133, 2002.

KYRIAKIS, S. C.; TSILOYIANNIS, V. K.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K.; TSINAS, A. C.; ALEXOPOULOS, C.; JANSEGGERS, L. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. **Research in Veterinary Science**, v. 67, n. 3, p. 223–228, 1999.

LALLÈS, J.-P.; BOSI, P.; SMIDT, H.; STOKES, C. R. Weaning — A challenge to gut physiologists. **Livestock Science**, v. 108, n. 1–3, p. 82–93, 2007.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Trends in Food Science & Technology**, p. 453–462, 2001.

LAWLOR, P. G.; LYNCH, P. B.; CAFFREY, P. J. Effect of fumaric acid, calcium formate and mineral levels in diets on the intake and growth performance of newly weaned pigs. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 45, p. 61–71, 2006.

LE DIVIDICH, J.; HERPIN, P. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. **Livestock Production Science**, v. 38, n. 2, p. 79–90, 1994.

LE DIVIDICH, J.; SÈVE, B. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, n. 2, p. 63–74, 2000.

LI, S. Y.; RU, Y. J.; LIU, M.; XU, B.; PÉRON, A.; SHI, X. G. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. **Livestock Science**, v. 145, n. 1–3, p. 119–123, 2012.

LI, Z.; YI, G.; YIN, J.; SUN, P.; LI, D.; KNIGHT, C. Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 2, p. 252–261, 2008.

LÜCKSTÄDT, C.; JONES, G.; NIES, W. Acid-phytobiotic blends a sustainable alternative for feed safety, animal health and natural growth promotion in pig farming. **Feed Mix**, v. 13, n. 4, p. 25–27, 2005.

MADEC, F.; BRIDOUX, N.; BOUNAIX, S.; CARIOLET, R.; DUVAL-IFLAH, Y.; HAMPSON, D. J.; JESTIN, A. Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 3–4, p. 295–310, 2000.

MADEC, F.; BRIDOUX, N.; BOUNAIX, S.; JESTIN, A. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1,

p. 53–72, 1998.

MAHAN, D. C.; LEPINE, A. J. Effect of pig weaning weight and associated nursery feeding programs on subsequent performance to 105 kilograms body weight. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 4, p. 1370–8, 1991.

MAKKINK, C. A.; BERNTSEN, P. J.; OP DEN KAMP, B. M.; KEMP, B.; VERSTEGEN, M. W. Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2843, 1994.

MANZANILLA, E. G.; NOFRARÍAS, M.; ANGUITA, M.; CASTILLO, M.; PEREZ, J. F.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; KAMEL, C.; GASA, J. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2743, 2006.

MANZANILLA, E. G.; PEREZ, J. F.; MARTIN, M.; KAMEL, C.; BAUCCELLS, F.; GASA, J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3210–8, 2004.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1017–23, 1999.

MCCRACKEN, B. A.; SPURLOCK, M. E.; ROOS, M. A.; ZUCKERMANN, F. A.; GASKINS, H. R. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, p. 613–9, 1999.

MELO, A. D. B.; GOIS, F. D.; ANDRADE, C. de; ROSTAGNO, M. H.; COSTA, L. B. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 12, n. 671, p. 227, 2014.

MELKEBEEK, V.; GODDEERIS, B. M.; COX, E. ETEC vaccination in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1–2, p. 37–42, 2013.

MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.; DIERICK, N.; FREMAUT, D.; MAENE, P.; DE SMET, S. *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans - cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2371–2381, 2008.

MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.; VAN HOORICK, A.; OVYN, A.; FREMAUT, D.; DE SMET, S.; DIERICK, N. Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 136–154, 2010.

MONTAGNE, L.; BOUDRY, G.; FAVIER, C.; HUËROU-LURON, I. Le; LALLÈS, J.-P.; SÈVE, B. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 01, p. 45, 2007.

MOREDO, F. A.; PIÑEYRO, P. E.; MÁRQUEZ, G. C.; SANZ, M.; COLELLO, R.; ETCHEVERRÍA, A.; PADOLA, N. L.; QUIROGA, M. A.; PERFUMO, C. J.; GALLI, L.; LEOTTA, G. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* subclinical infection in pigs: bacteriological and genotypic characterization and antimicrobial resistance profiles. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 8, p. 704–711, 2015.

MOSENTHIN, R.; SAUER, W. C.; AHRENS, F.; DE LANGE, C. F. M.; BORNHOLDT, U. Effect of dietary supplements of propionic acid, siliceous earth or a combination of these on the energy, protein and amino acid digestibilities and concentrations of microbial metabolites in the digestive tract of growing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 37, n. 3–4, p. 245–255, 1992.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 443–454, 2005.

NAMKUNG, H.; LI J. GONG, M.; YU, H.; COTTRILL, M.; DE LANGE, C. F. M. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 697–704, 2004.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPELYARD, G.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER, J. M. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 242–252, 2003.

OETTING, L. L.; UTIYAMA, C. E.; GIANI, P. A.; RUIZ, U. D. S.; MIYADA, V. S. Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1389–1397, 2006.

OMONIJO, F. A.; NI, L.; GONG, J.; WANG, Q.; LAHAYE, L.; YANG, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, p. 1–11, 2017.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E. J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v. 4, n. 1, p. 23–31, 1995.

OUATTARA, B.; SABATO, S. F.; LACROIX, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1–2, p. 1–9, 2001.

PAPATSIROS, V.; BILLINIS, C. The prophylactic use of acidifiers as antibacterial agents in swine. In: BOBBARALA, V. (ed). **Antimicrobial Agents**. Rijeka, Croatia: InTech, p. 295–310, 2012.

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 01, p. 117, 1999.

PARTANEN, K.; SILJANDER-RASI, H.; PENTIKÄINEN, J.; PELKONEN, S.; FOSSI, M. Effects of weaning age and formic acid-based feed additives on pigs from weaning to slaughter. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 336–356, 2007.

PAUL, S.; SAMANTA, G.; HALDER, G.; BISWAS, P. Effect of a combination of organic acid salts as antibiotic replacer on the performance and gut health of broiler chickens. **Livestock Research for Rural Development**, v. 19, n. 11, 2007.

PIERZYNOWSKI, S. G.; WESTRÖM, B. R.; SVENDSEN, J.; SVENDSEN, L.; KARLSSON, B. W. Development and regulation of porcine pancreatic function. **International Journal of Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology**, v. 18, n. 2, p. 81–94, 1995.

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. 1–3, p. 215–236, 1997.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Bactérias patogênicas. In:\_\_\_\_\_. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1st. ed. Porto Alegre: Artmed, p.55-216, 2005.

PROHÁSZKA, L.; BARON, F. The predisposing role of high dietary protein supplies in enteropathogenic *E. coli* infections of weaned pigs. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 27, n. 3, p. 222–232, 2010.

RADCLIFFE, J. S.; ZHANG, Z.; KORNEGAY, E. T. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1880–6, 1998.

RADECKI, S. V.; JUHL, M. R.; MILLER, E. R. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 10, p. 2598–605, 1988.

RANTZER, D.; KIELA, P.; THAELA, M. J.; SVENDSEN, J.; AHREN, B.; KARLSSON, S.; PIERZYNOWSKI, S. G. Pancreatic exocrine secretion during the first days after weaning in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1324–1331, 1997.

RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 4, p. 313–322, 1993.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an Overview. **Complementary Medicine Research**, v. 16, n. 2, p. 79–90, 2009.

REMMAL, A.; ACHAHBAR, S.; BOUDDINE, L.; CHAMI, N.; CHAMI, F. *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 121–126, 2011.

RHOUMA, M.; BEAUDRY, F.; THÉRIAULT, W.; LETELLIER, A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and

one health perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1789, 2016.

RHOUMA, M.; FAIRBROTHER, J. M.; BEAUDRY, F.; LETELLIER, A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 1, p. 31, 2017.

RIBEIRO, P. R.; KRONKA, R. N.; THOMAZ, M. C.; CASTILLO SOTO, W. L.; G SILVA, L. P.; KRONKA, S. N.; HANNAS, M. I. Adição de ácido fumárico em rações de suínos e seus efeitos nas fases inicial e crescimento/ terminação. **ARS Veterinaria**, v. 18, n. 1, p. 70–77, 2002.

RICKE, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632–639, 2003.

RISLEY, C. R.; KORNEGAY, E. T.; LINDEMANN, M. D.; WEAKLAND, S. M. Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 35, n. 3–4, p. 259–270, 1991.

ROPPA, L. Nutrição dos leitões na fase pós-desmame. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1, 1998, Fortaleza. **Anais...**, Ceará, p. 265-271, 1998.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Use of acetic acid in the feeding of piglets. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 41, n. 3/4, p. 253–258, 1988.

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

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363–370, 1992.

SAKATA, T.; ADACHI, M.; HASHIDA, M.; SATO, N.; KOJIMA, T. Effect of n-butyric acid on epithelial cell proliferation of pig colonic mucosa in short-term culture. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 102, n. 4, p. 163–4, 1995.

SANTOS, L. ; MASCARENHAS, A.; OLIVEIRA, H. Fisiologia digestiva e nutrição pós desmame em leitões. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 13, n. 1, p. 4570–4584, 2016.

SCHIERACK, P.; STEINRÜCK, H.; KLETA, S.; VAHJEN, W. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6680–6, 2006.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 6, p. 431–437, 2001.

SEAL, B. S.; LILLEHOJ, H. S.; DONOVAN, D. M.; GAY, C. G. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. **Animal Health Research**

**Reviews**, v. 14, n. 01, p. 78–87, 2013.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8, 1994.

SILVA, M. C. Efeito da adição de acidificantes e suas combinações na alimentação de leitões desmamados sobre o desempenho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002.

SILVA JUNIOR, A. da. Interações químico-fisiológicas entre acidificantes, probióticos, enzimas e lisofosfolipídios na digestão de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. spe, p. 238–245, 2009.

SMITH-PALMER; STEWART; FYFE. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118–122, 1998.

SNOECK, V.; HUYGHEBAERT, N.; COX, E.; VERMEIRE, A.; SAUNDERS, J.; REMON, J. P.; VERSCHOOTEN, F.; GODDEERIS, B. M. Gastrointestinal transit time of nondisintegrating radio-opaque pellets in suckling and recently weaned piglets. **Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 94, n. 1, p. 143–53, 2004.

SOARES, T.G. **Efeito da desmama com 12, 15 e 18 dias de idade sobre o desempenho de leitões**. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Ácidos carboxílicos e seus derivados. Adição-eliminação nucleofílica no carbono acílico o. In:\_\_\_\_\_. **Química Orgânica 2**. 7th. ed. Rio de Janeiro: LTC, p.85–86, 2002.

SOUZA, E. L. de; BARROS, J. C. de; CONCEIÇÃO, M. L. da; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V. da. Combined application of origanum vulgare l. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 387–393, 2009.

SURBURG H.; PANTEN, J. Individual fragrance and flavor materials. In: \_\_\_\_\_. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, properties and uses**. 5th. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p 64–137, 2006.

SUIRYANRAYNA, M. V. A. N.; RAMANA, J. V. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 45, 2015.

SULTANBAWA, Y. Plant antimicrobials in food applications: minireview. In: \_\_\_\_\_. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, p. 1084–1099, 2011.

SUMANO, H.; OCAMPO, L. Promotores de crecimiento. In:\_\_\_\_\_. **Farmacología Veterinaria**. 3rd. ed. Mexico: Mcgraw-Hill / Interamericana, p. 370, 2006.

SUZUKI, O. H.; ELIAS, M.; SILVA, T. Uso de óleos essenciais na alimentação de leitões. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 4, p. 519–526, 2008.

SVENSMARK, B.; NIELSEN, K.; WILLEBERG, P.; JORSAL, S. E. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. II. Post-weaning diarrhoea. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 30, n. 1, p. 55–62, 1989.

TEIXEIRA, A. de O.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; DONZELE, J. L.; COSTA, I. R. S.; OLIVEIRA, R. F. M. de; FERREIRA, V. P. de A.; SOUZA, A. V. C. de. Efeito de dietas simples e complexas sobre a morfo-fisiologia gastrointestinal de leitões até 35 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 926–934, 2003.

THAELA, M.-J.; JENSEN, M.; PIERZYNOWSKI, S.; JAKOB, S.; JENSEN, B. Effect of lactic acid supplementation on pancreatic secretion in pigs after weaning. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 7, n. Suppl. 1, p. 181–183, 1998.

THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Effect of short-chain fatty acids on the size of enteric bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 408–12, 1996.

TORRALLARDONA, D.; BADIOLA, I.; BROZ, J. Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. **Livestock Science**, v. 108, n. 1–3, p. 210–213, 2007.

TORRALLARDONA, D.; CONDE, R.; BADIOLA, I.; POLO, J. Evaluation of spray dried animal plasma and calcium formate as alternatives to colistin in piglets experimentally infected with *Escherichia coli* K99. **Livestock Science**, v. 108, n. 1–3, p. 303–306, 2007.

TSILOYIANNIS, V. K.; KYRIAKIS, S. C.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 3, p. 287–293, 2001.

TUNYAPANIT, W.; PRUEKPRASERT, P.; LAOPRASOPWATTANA, K.; CHELAE, S. *In vitro* activity of colistin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Songklanagarind Hospital, Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, n. 2, p. 273–80, 2013.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 373–8, 2001.

UTIYAMA, C. E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém- desmamados**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens), Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

VALCHEV, G. Organic acids in combined forages for growing pigs. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 24, p. 3–4, 2008.

VAN BEERS-SCHREURS, H. M. G.; VELLENGA, L.; WENSING, T.; BREUKINKI, H. J. The Pathogenesis of the post-weaning Syndrome in weaned piglets; A review. **Veterinary Quarterly**, v. 14, p. 29–34, 1992.

VAN BEERS-SCHREURS, H. M.; NABUURS, M. J.; VELLENGA, L.; KALSBECK-VAN DER VALK, H. J.; WENSING, T.; BREUKINK, H. J. 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. 947–53, 1998.

VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G.C.J.J. **Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and Other Major Markets in the European Union.** CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116, 1999.

VAN DEN BROECK, W.; COXA, E.; GODDEERISAB, B. . Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 *fimbriae*. **Vaccine**, v. 17, n. 15–16, p. 2020–2029, 1999.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Pathophysiology of swine diarrhea. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2233–2242, 2009.

VERDONK, J. M. A. J.; BRUININX, E. M. A. M.; VAN DER MEULEN, J.; VERSTEGEN, M. W. A. Post-weaning feed intake level modulates gut morphology but not gut permeability in weaned piglets. **Livestock Science**, v. 108, n. 1–3, p. 146–149, 2007.

VERSTEGEN, M. W. A.; WILLIAMS, B. A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 113–127, 2002.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ NAVAJAS, Y.; SÁNCHEZ ZAPATA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 1, p. 13–19, 2010.

VU KHAC, H.; HOLODA, E.; PILIPCINEC, E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 10, 20 2006.

WEISSINGER, W. R.; MCWATTERS, K. H.; BEUCHAT, L. R. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 442–50, 2001.

WHITE, L. A.; NEWMAN, M. C.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 10, p. 2619, 2002.

WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry1. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. suppl\_14, p. E140–E148, 2008.

XU, Y. T.; LIU, L.; LONG, S. F.; PAN, L.; PIAO, X. S. Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 110–119, 2018.

YAN, L.; WANG, J. P.; KIM, H. J.; MENG, Q. W.; AO, X.; HONG, S. M.; KIM, I. H. Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. **Livestock Science**, v. 128, n. 1–3, p. 115–122, 2010.

YOUSEF, J. M.; CHEN, G.; HILL, P. A.; NATION, R. L.; LI, J. Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4044–4049, 2011.

ZENG, Z.; XU, X.; ZHANG, Q.; LI, P.; ZHAO, P.; LI, Q.; LIU, J.; PIAO, X. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 279–285, 2015a.

ZENG, Z.; ZHANG, S.; WANG, H.; PIAO, X. 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, 2015b.

ZHAI, H.; LIU, H.; WANG, S.; WU, J.; KLUENTER, A.-M. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 179–186, 2018.

ZHANG, S.; JUNG, J. H.; KIM, H. S.; KIM, B. Y.; KIM, I. H. Influences of phytoncide supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, diarrhea scores and fecal microflora shedding in weaning pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 9, p. 1309–1315, 2012.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N.; EMILIO, D.; NEVES, S. Patogenia das diarreias dos suínos : modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. Supl 1, p. s81–s86, 2008.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de uma mistura de óleos essenciais e ácidos orgânicos sobre a homeostase dos tecidos com ênfase na integridade intestinal de leitões expostos ao desafio com *Escherichia coli* enterotóxica, como uma alternativa possível à medicação preventiva com antibióticos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os efeitos dos produtos colistina e da mistura de óleos essenciais e ácidos orgânicos sobre a morfologia do intestino, fígado, linfonodo mesentérico, baço, rim e pulmão nos leitões expostos a *E. coli*.
- Comparar os efeitos dos produtos testados sobre a morfologia e morfometria intestinal e demais órgãos em leitões expostos a *E. coli* enterotóxica.
- Avaliar os efeitos dos produtos testados sobre o estresse oxidativo do jejuno, íleo e fígado.

#### 4. ARTIGO A

### EFFECTS OF A BLEND OF ORGANIC ACIDS AND CINNAMON ESSENTIAL OIL ON INTESTINAL HOMEOSTASIS OF PIGLETS EXPOSED TO ENTEROTOXIC *Escherichia coli* (ETEC)

**ABSTRACT-** Organic acids and essential oils have a long history of use in pig feeding as alternatives to antibiotic growth promoters. However, their interactive effects on the intestinal integrity and other tissues have been few investigated. Therefore, the aim of this study was to assess the impact of a commercial blend (CB) of organic acids and cinnamon essential oil on the intestinal integrity of piglets exposed to challenge with enterotoxic *Escherichia coli*, as a possible alternative to preventive medication with antibiotics. Thirty weaned piglets from 21 days old with a body weight of  $6.06 \pm 0.25$  kg were used in a 19-d experiment. Pigs were subject during seven days to a standard diet and then were allotted to five dietary treatments, using six replicates per treatment. Dietary treatments were: 1) control: basal diet free of challenge and challenged treatments: 2) *Escherichia coli*, basal diet without additives; 3) colistin, basal diet supplemented with 200 mg/kg of colistin + *E. coli*; 4) commercial blend (CB) 1, basal diet with 1 kg CB/ton + *E. coli*; and 5) CB2, basal diet with 2 kg CB/ ton + *E. coli*. Seven days after the beginning of the treatment the animals were orally challenged with 5ml of an enterotoxic strain ( $1,1 \times 10^9$  CFU/mL) of *E. coli* K88 for pigs. Five days after the challenge, the animals were euthanized for sampling of jejunum and ileum for histological, morphometric and oxidative stress analysis. The histological sections were analyzed to determine the lesion score, villi height (VH), crypt depth (CD), number of inflammatory cells and goblet cells density. Oxidative stress analysis was evaluated by spectrophotometric assays. The reduced glutathione (GSH), ferric-reducing ability potential (FRAP) and free-radical scavenging ability (ABTS) assays were used to evaluate the intestinal antioxidant defense. Lipid peroxidation and superoxide anion production were evaluated through the levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay, respectively. Data were submitted to analysis of variance and Tukey test considering  $p \leq 0.05$ . Animals fed the CB (1 and 2) and colistin diets presented a decrease ( $P < 0.05$ ) on histological changes on the intestine. Morphometry indicated greater villus height and higher VH:CD ratio in animals of the CB2 compared to *E. coli* group, but these results did not differ from the animals supplemented with colistin. The colistin and CB (1-2) groups decreased ( $P < 0.05$ ) the number of inflammatory cells (lymphocytes, plasma cells and eosinophils) in lamina propria in relation to the *E. coli* group. On the other hand, in jejunum the CB2 treatment increased ( $P < 0.05$ ) intestinal cell proliferation compared to the control and colistin groups. The commercial blend (especially CB2) supplementation induced a decrease ( $P < 0.05$ ) in the TBARS and NBT levels in the intestine compared with the control and *E. coli* groups. An increase ( $P < 0.05$ ) in GSH and FRAP ileal levels when compared to *E. coli* group was also observed. These results show that the inclusion of commercial blend in the diet, especially at a dose of 2kg / ton (CB2) improved the intestinal morphology and protected the intestinal mucosa against ETEC oxidative damage. This blend was efficient to replace colistin and can serve as an alternative to in-feed antibiotics during the first few weeks post-weaning for pigs.

**Key-Words:** Colistin, Jejunum, Ileum, Intestinal Morphology, Oxidative Stress.

## INTRODUCTION

Piglets are exposed to diverse stress factors during weaning. These may contribute to intestinal, immunological and behavioral changes, characterized by low food intake, growth performance or weight loss (Pluske et al., 1997; Partanen et al., 2007). Furthermore, weaning is associated with post-weaning diarrhea (PWD), which is generally caused by the proliferation of  $\beta$ -haemolytic strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) (Pluske et al., 1997). Sub-therapeutic doses of antibiotics as colistin have showed effectiveness in the treatment of PWD (Rhouma et al., 2017). However, the risk of drug-resistant bacteria has led to several countries to ban the use of antibiotics in swine diets (Schwarz et al., 2001). Therefore, many studies have evaluated the effect of dietary additives on intestinal health and growth performance of weaned piglets (Thacker, 2013).

Consumption of organic acids and their salts have been shown to enhance the performance of weaned piglets (Partanen et al., 2007; Braz et al., 2011). Organic acids have showed antimicrobial activity, because decreasing the pH of the diet and digestive tract, induce an increase in the population of acid lactic bacteria, creating a negative environment for the pathogenic microorganism (Tsiloyiannis et al., 2001). Moreover, the ability of the non-dissociated form of organic acids to penetrate the cell wall of bacteria and disrupt their normal physiology has been evaluate (G. Papatsiros and Billinis, 2012). Most studies in pigs have been performed using formic, propionic, lactic, citric acid or the corresponding salts and, to a lesser extent, butyrate (Manzanilla et al., 2006). However, formic acid appears to be the most attractive feed additive because it improves the growth performance of pigs at lower doses than other organic acids (Partanen et al., 2007; Suiryanrayna and Ramana, 2015).

Essential oils have been recognized as dietary additives for the development of growth enhancers for weaned piglets (Franz et al., 2010; Zeng et al., 2015). The essential oils (EO) or also called volatile or ethereal oils are aromatic oily liquids obtained from plant materials (Yan et al., 2010), through various processes, but the steam distillation method is the most commonly used (Burt, 2004). Antibacterial activity of EO is mainly associated to their components such as phenols (carvacrol, eugenol and thymol), terpenes ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-o) and aldehydes; and also depending on their concentration in the oil (Ceylan and Fung, 2004). It is well known that EO and

plant extracts have anti-oxidative effects in animal diets (Baschieri et al., 2017). Several studies evaluating the effect of organic acids and essential oils on performance showed that they are more effective when combined than when they are administered individually (Cho and Kim, 2015; Zeng et al., 2015). However, the interactive effect of these additives on the integrity of the intestinal mucosa (not only on morphometry) has been few analyzed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects a mixture of organic acids and cinnamon essential oil on the intestinal integrity of piglets exposed to enterotoxic *Escherichia coli*, as a possible alternative to preventive medication with antibiotics.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals, diets and experimental design*

This experiment was approved by the Ethics Committee on the use of animals of the State University of Londrina, CEUA Protocol number 13812.2017.19031201386. A total of 30 piglet were used (half-castrated males and half females). The animals were weaned at 21 days, with average weights of 6.06 kg (SD 0.25). During seven days, they received a standard diet. Then, the animals were randomly divided and subjected to five treatments during 12 days with six repetitions per treatment. Dietary treatments were 1) Control (basal diet), 2) *Escherichia coli* (basal diet + challenge with *E. coli*), 3) Colistin (basal diet + 200 mg/kg of colistin + challenge with *E. coli*), 4) commercial blend (CB) 1 (basal diet + 1 kg CB/ton + challenge with *E. coli*), and 5) CB 2 (basal diet + 2 kg CB/ton + challenge with *E. coli*). One kilogram of the commercial blend guarantees inclusion in the diet of 1.8% of formic acid (ammonium formate), 0.9% acetic acid, 0.45% propionic acid, and 0.35% fumaric acid and 0.04% cinnamon essential oil. During the trial the piglets received two diets (Table 1), formulated according their requirements, being represented by pre-starter II (28 – 38 days old) and starter I (39 – 40 days old). The piglets were fed ad libitum. The pen's area had 2.7 m<sup>2</sup>, linear feeder, nipple drinker, partially slatted floor and the environmental temperature was controlled by the infrared lamps and by the curtains management. Seven days after the beginning of the treatment, the animals of all groups except the control group received orally 5mL (1,1x10<sup>9</sup> CFU/mL) of the enterotoxic strain of *E. coli* K88:LT (rNal, rRif) for swine. Five days after the challenge, all animals (40-day-old)

were euthanized (electrical stunning followed by cardiac exsanguination). Then samples of jejunum and ileum were fixed in a buffered solution of formalin 10% for histological and morphometric analysis. In addition, jejunal and ileal samples were immediately frozen at -80°C for the stress oxidative analysis

#### *Preparation of the inoculum and inoculation*

*E. coli* strains used in the study were derived from the bacteria bank of the State University of Londrina (Avian Medicine Laboratory). These strains were recovered from clinical cases of piglets with PWD. The experiment began with the induction of resistance in isolates of enterotoxigenic *E. coli* (K88ab; K88; 987p; paa) to rifampicin (Rif) and nalidixic acid (Nal). The induction of antimicrobial resistance consists of cultivating the microorganism in broth and agar in different concentrations of antibiotics as previously described (Daudelin et al., 2011). The total process to obtain clones of *E. coli* resistant took 24 days to complete (12 days - for each antimicrobial). Four samples of enterotoxigenic *E. coli* resistant to Nal and Rif were cultured in BHI broth at 37°C for 24h. The samples were individually cultured and a pool was formed prior to inoculation. Seven days after the beginning of the treatment, the animals received orally 5mL of ETEC inoculum containing  $1,1 \times 10^9$  CFU/mL (Rhouma et al., 2015). The inoculum was performed as a single administration. After inoculum, the animals received 10mL of CaCO<sub>3</sub>. Both administrations were performed using a syringe attached to a polyethylene tube. CaCO<sub>3</sub> was used to increase bacterial survival in the stomach and to provide safe transfer of the inoculum into the small intestine (Rhouma et al., 2015).

#### *Histological assessment*

Following fixation, the samples were dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Sections (5 µm) were stained with haematoxylin–eosin for histopathological evaluation. The histological sections were analyzed to determine the lesional score using an adapted method as previously described (Bracarense et al., 2012). As displayed in Table 2, microscopic observations led to the identification of different lesions in the intestine, and allowed for establishing a lesional score per animal. For both the jejunum and the ileum, the minimal score was 0 and the maximal lesional score was 42 (Table 2). For morphometric analysis, villi height and crypt depth

were measured randomly on thirty villi using an image analysis system (MOTIC Image Plus 2.0, Motic Instruments, Richmond, Canada). To evaluate goblet cell density, sections of the intestine were stained with Periodic Acid-Schiff (PAS). Positively stained goblet cells were counted randomly in 30 villi and crypts per sample. The number of lymphocytes, plasma cells and eosinophils was counted randomly based on morphology on three fields per sample at 40x magnification. The number of mitotic figures in the intestinal crypts was counted in five fields per slide using 40x magnification. Each field corresponds to a surface area of 1.5 mm<sup>2</sup>.

*Determination of antioxidant capacity by the reduced glutathione (GSH), ferric-reducing ability potential (FRAP) and free-radical scavenging ability (ABTS) assays*

The GSH intracellular level of samples were evaluated by an adapted method described previously (Sedlak and Lindsay, 1968). The assay is based on the reaction of GSH with dithiobisnitrobenzoic acid (DNTB) to form the yellow derivative thionitrobenzoic acid (Rahman et al., 2007). The tissues were homogenized in cold 0.02M EDTA buffer using a Tissue Tearor (Biospec, São Paulo, SP, Brazil). After the addition of 50% trichloroacetic acid (50% w/v), the homogenates were centrifuged (1,500 xg, 15min). Then, 0.4M Tris-HCl (pH 8.9) and 10mM DNTB were added to the supernatant and the samples were vortex-mixed. After 5 min, the absorbances of the samples are read at 412 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland). A standard curve was prepared using different concentrations of GSH, and other reagents as previously described. The results were presented as mmols of GSH per milligrams of protein.

The frozen samples were processed and homogenized with 500 µL of 1.15% KCl, then centrifuged (200 xg, 10min, 4°C) and the supernatant were used in FRAP and ABTS assays (Pinho-Ribeiro et al., 2015).

The FRAP method is based on the production of Fe<sup>2+</sup> ion (ferrous form) from the reduction of the Fe<sup>3+</sup> ion (ferric form) present in the tripyridyltriazine complex (TPTZ) by means of antioxidants present in the samples. This assay provides a very useful 'total' antioxidant concentration (Antolovich et al., 2002). For the FRAP assay, supernatant (15 µL) was mixed with deionized water (45 µL) and freshly prepared FRAP reagent (200 µL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Then, the mixture

was incubated for 30 min at 37°C and the absorbance was measured at 595 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). The ABTS procedure was performed according to Hohmann et al. (2013), and it is based on the ability of the antioxidants molecules to reduce the ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>). Initially, for the ABTS assay, a ABTS<sup>•+</sup> solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was diluted with phosphate buffer saline at pH 7.4 to reach an absorbance of 0.80 at 730 nm. Then, 200 µL of diluted ABTS<sup>•+</sup> solution was mixed with the supernatant (15 µL). After 6 min, the absorbance was measured at 730 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). The results of both assays were compared with a standard Trolox curve, prepared using different concentrations (1.5–30 µmol/l, final concentrations). The protein levels in the samples were used for data normalization, and the results were expressed as nmol of Trolox (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) equivalent per milligrams of protein in both assays.

*Determination of the oxidative response by nitroblue tetrazolium (NBT) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assays*

The superoxide anion production was determined by the reduction of the redox dye nitroblue tetrazolium (NBT) (Amresco, Solon, OH, USA) (Fattori et al., 2015). The tissues were homogenized with 500 µL of 1.15% KCl and aliquots of 50 µL of homogenate were transferred to a 96-well plate. After, the addition of 100 µL of NBT solution (1 mg/mL) the plates were maintained at 37°C in a warm bath for 1 h. Then, after removal of the supernatant, the formazan precipitated was solubilized by adding of 2M KOH (120 µL) and of dimethyl sulfoxide (140 µL) (DMSO). To measure the optical density, a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 600 nm was used. For normalization of the data, the protein levels in the samples were used and the results were presented as NBT reduction (optical density [OD] per milligram of protein).

Lipid peroxidation in tissues was assessed by determining TBARS levels using an adapted method (Guedes et al., 2006). This procedure measures the Malondialdehyde (MDA) an intermediate product of lipid peroxidation (Fattori et al., 2017). After, the protein content of the homogenate be removed by addition of trichloroacetic acid (10%) followed by centrifugation (1,000 ×g, 3min, 4°C), the

thiobarbituric acid (0.67%) was added to precipitate. These mixtures were kept for 15 minutes in a boiling water bath (100°C) and transferred to an ice bath. MDA was determined by the difference between absorbances at 535 and 572 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). The results were presented as TBARS (OD A535-A572/mg of protein).

### *Statistical analysis*

For statistical analysis, the results were presented as mean  $\pm$  standard deviation. They were analyzed for residue normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett's test). When both assumptions were met and validated, analysis of variance (ANOVA) was applied followed by the Tukey test for multiple comparisons, using treatment as the classification factor. The results were statistically analyzed considering a 5% significance level, using the statistical software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## **RESULTS**

### *Effects of colistin and commercial blend on the histology and morphometry of the intestine*

In the intestine, the main findings observed in all groups were edema of the lamina propria, mild villi atrophy and fusion and flattening of enterocytes (Fig. 1A-D). These findings were more severe in the *E.coli* group with apical necrosis as the main lesion (Fig.1A). In addition, an increased frequency of bacterial adherence on enterocytes was verified in this group.

The lesional score of jejunum and ileum was shown in fig. 2A. A significant decrease (~2.5 fold) in the lesional score was observed in the jejunum of piglets of the CB1 and CB2 groups when compared to the control and *E. coli* groups. In the jejunum a reduction in the frequency of bacterial adherence was observed in the Colistin, CB1 and CB2 groups (17% of bacterial adherence for Colistin and CB1, and 0% for CB2) compared to the control (50% of bacterial adherence) and *E. coli* (60% of adherence) groups (Fig. 3B). In addition, a significant increase ( $P = 0.04$ ) in villi height was observed in jejunum of piglets exposed to diet with CB2 compared to the *E.coli* group (Fig. 4A). On the other hand, a significant decrease ( $P = 0.04$ ) in the crypt depth of pigs

that receiving the CB2 compared to the *E. coli* group. (Fig. 4A). Piglets of the Colistin and CB2 groups showed a significant increase ( $P = 0.006$  and  $P = 0.001$ ) in the ratio villi height: crypt depth compared to the *E. coli* group (Fig. 4B).

In the ileum, a decrease in the lesional score ( $P = 0.006$ ) was verified in the Colistin and CB2 groups compared to the *E. coli* group (Fig. 2B). A reduction in the frequency of bacterial adherence was observed in the ileum of the CB2, CB1 and Colistin groups (17% of bacterial adherence for CB1 and Colistin, and 25% for CB2) compared to the control (40% of bacterial adherence) and *E. coli* (50% of adherence) groups (Fig. 3B). In addition, a significant increase in villi height was observed in piglets of the CB2 group compared to the control ( $P = 0.008$ ), *E. coli* and CB1 ( $P = 0.001$ ) groups (Fig. 4A). A significant decrease ( $P = 0.04$ ) in the crypt depth of pigs that receiving the colistin (COL) compared to the *E. coli* group (Fig. 4A). Concerning the ratio villi height: crypt depth in the ileum, piglets fed CB2 and Colistin showed a significant increase ( $P = 0.001$ ) compared to the *E. coli* group (Fig. 4B).

No change in the number of goblet cells was observed in the jejunum and ileum in both villi and crypt region (data not show). In general, a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the number of lymphocytes, plasma cells and eosinophils in both regions was observed in piglets of the *E. coli* group when compared to the other treatments (Fig. 5).

Enterocyte proliferation was estimated by counting the number of mitosis figures in the intestinal crypts. The mean number of mitosis per microscopic field in the jejunum and ileum was disposed on Table 3. A significant increase ( $P < 0.001$ ) in cell proliferation was observed in the jejunum of the pigs of the CB2 group when compared to the control.

#### *Antioxidant capacity and oxidative response in the intestine of piglets fed the experimental diets*

The addition of commercial blend (CB2) in challenged animals induced a significant reduction ( $P = 0.009$  and  $P = 0.01$ ) in the concentration of TBARS and NBT levels (Table 4) and a significant increase ( $P < 0.001$  and  $P = 0.002$ ) in GSH and FRAP ileal levels when compared to *E. coli* group. ABTS levels showed a significant decrease

( $P < 0.001$ ) in the jejunum of the animals of the Colistin group compared to the control group, and a significant decrease ( $P < 0.001$ ) in the ileum of the animals of the CB1 group, when compared with the *E. coli* group. On the other hand, GSH levels in the jejunum of the pigs of CB2 showed a significant increase ( $P < 0.001$ ) when compared to the Colistin group. In the ileum of the piglets supplemented with CB2, a significant increase ( $P < 0.001$ ) in GSH levels compared to the other groups was also observed (Table 4).

The jejunum and ileum of the animals of the *E. coli* group showed a significant increase ( $P = 0.01$ ) in lipid peroxidation (TBARS) compared to control group. Colistin, CB1 and CB2 supplementation decreased significantly ( $P < 0.01$ ) the jejunal levels of NBT compared to the control group. The ileal region of the control and *E. coli* groups showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the levels of GSH and FRAP compared to the supplemented groups (Table 4).

## DISCUSSION

There is a growing awareness about the use of feed medication (antimicrobials as growth promoters) in livestock diets and the risk of developing cross-resistance of pathogens to antibiotics, threatening human and animal health (Phillips, 2003). Organic acids, as well as oils have received much attention in pig production due to their natural antimicrobial properties and beneficial effects on growth performance (Dorman and Deans, 2000; Namkung et al., 2004; Partanen et al., 2007; Windisch et al., 2008). The small intestine plays an important role in the etiology of digestive disorders. The gastrointestinal tract not only provides for the digestion and absorption of nutrients, but also acts as a selective barrier protection against harmful antigens, toxins and pathogens (Lallès et al., 2004).

Organic acids and essential oils act through different mechanisms on the intestinal tract. Organic acids are known to be able to prevent the colonization and proliferation of pathogenic bacteria in the intestine (Van Immerseel et al., 2006), exerting positive actions, such as maintaining organ integrity and promoting mucosal villus height (Owusu-Asiedu et al., 2003). On the other hand, essential oils can stimulate digestive secretions (Platel and Srinivasan, 2004) helping intestinal morphological development (Utiyama et al., 2006). The main histological findings observed in our study were edema

of the lamina propria, mild villi atrophy and fusion and flattening of enterocytes in all groups. Villus atrophy is mainly caused by an increased rate of cell apoptosis and decreased rate of renewal (van der Peet-Schwering et al., 2007). It is important to highlight that these findings were less severe in the groups that received the commercial blend when compared to the control groups. A decrease of approximately 2.5 fold of the intestinal lesional score was observed in the CB1 and CB2 groups compared with the control and *E.coli* groups, being very similar to the score of the colistin group.

A reduction in the frequency of intestinal bacterial adherence was also observed in the jejunum of the animals receiving both the commercial blend and the antibiotic compared to the other groups. For ETEC to cause intestinal infection, it must first adhere to the intestinal mucosa using its fimbriae (Fairbrother et al., 2005), increasing intestinal permeability, and thus reducing the barrier function (Kiarie et al., 2008). Our results indicate that the commercial blend of organic acids and cinnamon essential oil prevented the attachment of pathogenic bacteria to the intestinal mucosa, thus minimizing its associated damage, which is consistent with the results of intestinal morphology obtained in this study. It is possible that the decrease in the number of pathogenic bacteria in the intestine enhances the proliferation of enterocytes resulting in an improvement of intestinal morphology (Mourão et al., 2006).

Increase in ileal villus height (VH) was observed in the intestine of the animals fed the commercial blend (CB2) when compared with *E.coli* group. Similarly, when weaned piglets received a mixture of organic acids and essential oils, an increase in jejunal VH was observed (Callegari et al., 2016; Xu et al., 2018). Longer VH are frequently used as an indicator of an improved absorptive capacity of the small intestine and a healthy gut (Pluske et al., 1997). Data regarding the effects of organic acids on gastrointestinal morphology of weaned piglets are varied. Studies showed diets supplemented with individual or combined organic acids lead to higher values of VH in the small intestine of weaned piglets (Bosi et al., 2007; Braz et al., 2011). On the other hand, other studies reported a reduction of VH after the acid supplementation in weanling pigs (Manzanilla et al., 2004; Gomes et al., 2007). In addition, no effect with the use of mixtures of organic acids was also reported (Namkung et al., 2004). These controversial effects are also found in weaned piglets supplemented with essential oils. Feeding piglets (3-weeks post-weaning) with a combination of 5% carvacrol, 3% cinnamaldehyde and 2% capsicum oleoresin increased the VH in the jejunum and ileum

(Manzanilla et al., 2006; Nofrarías et al., 2006). However, a study conducted by Kroismayr et al. (2008) showed a tendency of reduced villi length in jejunum and ileum by essential oils, even though other previous reports showed no change in pigs (Namkung et al., 2004; Li et al., 2012).

Crypt depth (CD) differences were observed in the jejunum, where the commercial blend (CB2) treatment decreased the crypt depth compared to the *E. coli* group. In addition, crypt depth remained similar in piglets receiving the commercial blend and colistin. Similar results were reported in previous studies using a mixture of organic acids and essential oils (Callegari et al., 2016) and herbal extracts plus organic acids (Namkung et al., 2004) in weaning piglets. In our study, deeper crypts were observed in the *E. coli* group, coinciding with shorter villi. It is known that the presence of ETEC can cause villous atrophy after weaning (McLamb et al., 2013), and this change may be followed by an increase in the depth of the crypts (Nabuurs et al., 1993). The increase in crypt depth is compatible with an increase in crypt-cell production rate and an overall stimulation of cell turn-over in the small intestine that is commonly associated with a reduced absorptive and digestive capacity (Pluske et al., 1996). The addition of the organic acid sodium butyrate (butyric acid salt) in the diet of weaned piglets resulted in an increase in crypt depth (Manzanilla et al., 2004). Furthermore, increases in crypt depth in the colon and jejunum of rats in response to n-butyric acid infusion have also been reported (Frankel et al., 1994). On the other hand, other authors found no effect on crypt depth in bacterially challenged piglets that received a diet supplemented with calcium formate (Bosi et al., 2007) or essential oils (carvacrol and thymol ) after weaning (Li et al., 2008).

These discrepant findings on VH and CD may be due to large variations in experimental methodologies, such as animal ages, sanitary conditions of animals, real or artificial disease challenge, type and dose of acid or oil used and basal diet. Therefore, it is quite difficult to compare the data on intestinal morphology in the different experiments, not only for these experimental variations, but also because there are no known standards for VH and CD measurements (Heo et al., 2013). In our study, the reason for the increase in intestinal villus height in pigs fed the CB2 diet compared with the *E. coli* group may be partly due to the antimicrobial properties of organic acids and essential oils. Preventing the proliferation and the attachment of ETEC to the intestinal mucosa, thus minimizing its associated damage in much the similar manner as

antibiotics, which is consistent with the intestinal morphology results obtained in the present study.

The net absorption in the small intestine depends on the VH/CD ratio, because the enterocytes show a secretory function when they are in the crypt and an absorption function when they migrate to the villi (Manzanilla et al., 2006). In addition, the renewal of the intestinal epithelium is a consequence of a dynamic equilibrium between the production of enterocytes in the crypt and desquamation in the villus (Willing and Van Kessel, 2007). It is known that decreases in this ratio impair absorption and increases the diarrhea risk. Thus, the VH/CD ratio is a useful criterion for evaluating intestinal health and function (Pluske et al., 1997). An increase in VH/CD ratio in the jejunum and ileum was observed in this study in pigs fed diets with colistin and CB2 when compared to pigs of the *E. coli* group. It is interesting to note that the VH/CD ratio values for piglets assigned to the CB2 treatment were similar to those of the pigs of the colistin treatment. Similar findings were reported in two *in vivo* studies in which dietary supplementation of an acid and essential oils blend improved the VH/CD ratio in the jejunum in weaned pigs (Callegari et al., 2016; Xu et al., 2018). A characteristic of ETEC infection is effacing the intestinal mucosa, which often leads to shorter villi and deeper crypts, thus reducing the VH/CD ratio (Fairbrother et al., 2005). These might explain why piglets consuming diet-containing CB2 had VH / CD ratio like those of piglets fed the colistin diet, indicating that providing CB2 in the diet was able to prevent ETEC from colonizing and damaging the intestinal mucosa, in much the same manner as in-feed antibiotics.

Epithelial cell proliferation was estimated by counting mitotic figures in intestinal crypts of the jejunum and ileum. We observed a significant increase in proliferating cells in the jejunum of the pigs of the CB2 group when compared to the control and colistin group. Other studies have demonstrated a positive effect on cell proliferation of the intestinal epithelium in presence of organic acids, particularly fatty acids such as butyric acid, when these are given orally (Huyghebaert et al., 2011; Bedford and Gong, 2017). Studies have also reported that intraluminal infusions of short-chain fatty acids exerted a stimulatory effect on the growth of colonic mucosa in humans (Topping and Clifton, 2001). Concerning essential oils, studies *in vitro* with intestinal epithelial cell showed no effect or suppression of cell proliferation (Bimczok et al., 2008; Putaala et al., 2017). Considering these different modes of action, we hypothesized that the increase in cell proliferation observed in the groups supplemented with the commercial blend was due

mainly to the action of organic acids. The beneficial effect of organic acids on intestinal epithelial cell proliferation could be due not only to their antimicrobial activity producing changes in the intestinal microbiota (Partanen and Mroz, 1999), but also due to the fact that organic acids can be used as a source of energy by the epithelial cells of the intestine stimulating the growth of the intestinal mucosa (Józefiak et al., 2004). Changes in gut microbiota can influence the epithelial cell turnover rates, since microbiota is one of the principal modulators of the epithelial cell activity (Sharma et al., 1995).

The lamina propria is usually populated by resident immune cells, including plasma cells, T cells and macrophages, which constitute over 60% of the cellular population in the lamina propria (McGhee et al., 1999). In this study, results indicate a greater number of inflammatory cells (lymphocytes, plasma cells and eosinophils) in the lamina propria of the jejunum and ileum of challenged piglets fed without additives (*E. coli* group) than in those supplemented with colistin and the commercial blend. It is known that luminal bacteria can produce changes in epithelial morphology and immune responses (McCracken and Lorenz, 2001). The number of lymphocytes increases, showing an adaptation of the gut wall to the high amount of antigen in the lumen (Rothkötter et al., 1991). The similar results in the number of inflammatory cells in colistin and commercial blend groups indicate that the challenge with *E. coli* did not produce an aggression as severe as in the animals fed no additives. Moreover, this might serve as direct evidence of a lower need for immune defense activity in the gut due to the antimicrobial action of colistin, organic acids and essential oils.

Oxidative stress is an important chemical mechanism that leads to biological damage, which occurs when there is a rise production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant system is overwhelmed by this excess (Omonijo et al., 2017). In this study, commercial blend induced in the intestine a decrease in lipid peroxidation (TBARS) and anion superoxide accumulation (NBT), in addition to an improvement in the capacity of antioxidant response (GSH and FRAP) when compared to the *E. coli* group.

This data demonstrated that CB supplementation (especially CB2) presented a protective effect on intestinal tissue reducing oxidative damage induced by bacterial challenge, mainly through the reduction of lipid peroxidation and to the improving antioxidant defense systems. Studies have indicated that supplementation in animal

diets of essential oils, organic acids and their mixtures have antioxidant effects (Abudabos and Al-Mufarrej, 2015; Tan et al., 2015; Xu et al., 2018). The antimicrobial effect of organic acids and essential oils, which produces quantitative changes in the intestinal microbiota, increasing the *Lactobacillus* group and decreasing *E. coli* or total coliforms (Suiryanrayna and Ramana, 2015; Zeng et al., 2015), might also have been responsible for the reduced concentration of ROS (Wei et al., 2017) and therefore lower levels of lipid peroxidation. Studies reported that *Lactobacillus* presents negative correlations with oxidative stress, by inhibiting ROS production, while, conversely, *E. coli* showed a strong positive correlation with intestinal oxidative stress (Sun et al., 2010; Xu et al., 2014). Our results showed that colistin supplementation produced a decrease in intestinal oxidative damage, possibly due to its antimicrobial effect (intestinal microbiota changes) and not through modulation of the resistance to oxidative damage.

## Conclusion

The results of the current study suggest that weaned pigs exposed to mixture of organic acids and cinnamon essential oil at a dose of 2kg / ton (3.6% of formic acid, 1.8 % of acetic acid, 0,9% of propionic acid, 0.7% of fumaric acid and 0.04 of cinnamon essential oil) has favorable effects on the intestinal integrity, protecting the intestinal mucosa against ETEC oxidative damage, even in the same or better way than the antibiotic colistin. Therefore, our study suggests that the blend of organic acids and essential oils could be used as an alternative to antibiotics for weaning pigs.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the 'Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior' (CAPES) and the 'Programa de Pós-graduação em Ciência Animal' of Universidade Estadual de Londrina. We also acknowledge Biomim (Inzersdorf-Getzersdorf, Austria) for providing the blend of essential oil and organic acids.

## REFERENCES

- Abudabos, A., and S. Al-Mufarrej. 2015. Effects of organic acid supplementation on antioxidant capacity and immune responses of broilers challenged orally with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium. *South African Journal of Animal Science* **44**, 342.
- Antolovich, M., P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards. 2002.

Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* **127**, 183–198.

Baschieri, A., M. D. Ajvazi, J. L. F. Tonfack, L. Valgimigli, and R. Amorati. 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry* **232**, 656–663.

Bedford, A., and J. Gong. 2017. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition*, 1–9.

Bimczok, D., H. Rau, E. Sewekow, P. Janczyk, W. B. Souffrant, and H.-J. Rothkötter. 2008. Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells *in vitro*. *Toxicology in Vitro* **22**, 652–658.

Bosi, P., G. Sarli, L. Casini, S. De Filippi, P. Trevisi, M. Mazzoni, and G. Merialdi. 2007. The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in *Escherichia coli* K88-challenged weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* **139**, 170–185.

Bracarense, A.-P.F.L., Luciola, J., Grenier, B., Drociunas Pacheco, G., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition* **107**, 1776–1786.

Braz, D. B., L. B. Costa, B. Berenchein, M. L. P. Tse, V. V. Almeida, and V. S. Miyada. 2011. Acidificantes como alternativa aos antimicrobianos promotores do crescimento de leitões. *Archivos de Zootecnia* **60**, 745–756.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 223–253.

Callegari, M. A., ; Aliny, K. Novais, E. R. Oliveira, ; Cleandro, P. Dias, ; Dalita, L. Schmoller, M. Pereira Junior, J. Gabriela, N. Dário, J. B. Alves, C. Abércio, and D. Silva. 2016. Microencapsulated acids associated with essential oils and acid salts for piglets in the nursery phase. *Semina: Ciências Agrárias* **37**, 2193–2208.

Ceylan, E., and D. Y. C. Fung. 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **12**, 1–55.

Cho, J., and I. Kim. 2015. Effects of microencapsulated organic acids and essential oils on growth performance and intestinal flora in weanling pigs. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **28**, 229–237.

Daudelin, J.-F., M. Lessard, F. Beaudoin, É. Nadeau, N. Bissonnette, Y. Boutin, J.-P. Brousseau, K. Lauzon, and J. Fairbrother. 2011. Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Veterinary Research* **42**, 69.

Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 308–316.

Fairbrother, J. M., É. Nadeau, and C. L. Gyles. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* **6**, 17–39.

Fattori, V., S. M. Borghi, C. F. S. Guazelli, A. C. Giroldo, J. Crespigio, A. J. C. Busmann, L. Coelho-Silva, N. G. Ludwig, T. L. Mazzuco, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2017. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- $\kappa$ B activation in mice. *Pharmacological Research* **120**, 10–22.

Fattori, V., F. A. Pinho-Ribeiro, S. M. Borghi, J. C. Alves-Filho, T. M. Cunha, F. Q. Cunha, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- $\kappa$ B activation. *Inflammation Research* **64**, 993–1003.

Frankel, W. L., W. Zhang, A. Singh, D. M. Klurfeld, S. Don, T. Sakata, I. Modlin, and J. L. Rombeau. 1994. Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* **106**, 375–380.

Franz, C., K. Baser, and W. Windisch. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **25**, 327–340.

G. Papatsiros, V. P., and C. Billinis. 2012. *The prophylactic use of acidifiers as antibacterial agents in swine*. In: Antimicrobial Agents. Vol. **3**. InTech.

Guedes, R.P., Bosco, L.D., Teixeira, C.M., Araújo, A.S.R., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Ribeiro, M.F.M., Partata, W.A., 2006. Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochemical Research* **31**, 603–609.

Gomes, F. E., D. O. Fontes, E. O. S. Saliba, W. M. Ferreira, E. T. Fialho, F. C. O. Silva, M. A. Silva, G. S. S. Corrêa, and G. M. Salum. 2007. Ácido fumárico e sua combinação com os ácidos butírico ou fórmico em dietas de leitões recém desmamados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **59**, 1270–1277.

Heo, J. M., F. O. Opapeju, J. R. Pluske, J. C. Kim, D. J. Hampson, and C. M. Nyachoti. 2013. 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* **97**, 207–237.

Hohmann, M. S. N., R. D. R. Cardoso, F. A. Pinho-Ribeiro, J. Crespigio, T. M. Cunha, J. C. Alves-Filho, R. V da Silva, P. Pinge-Filho, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2013. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *BioMed Research International* **2013**, 627046.

Huyghebaert, G., R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* **187**, 182–188.

Van Immerseel, F., J. B. Russell, M. D. Flythe, I. Gantois, L. Timbermont, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella*

in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology* **35**, 182–188.

Józefiak, D., A. Rutkowski, and S. . Martin. 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Animal Feed Science and Technology* **113**, 1–15.

Kiarie, E. G., B. A. Slominski, D. O. Krause, and C. M. Nyachoti. 2008. Nonstarch polysaccharide hydrolysis products of soybean and canola meal protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets. *The Journal of Nutrition* **138**, 502–8.

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

Lallès, J.-P., G. Boudry, C. Favier, N. Le Floc'h, I. Luron, L. Montagne, I. P. Oswald, S. Pié, C. Piel, and B. Sève. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* **53**, 301–316.

Li, P., X. Piao, Y. Ru, X. Han, L. Xue, and H. Zhang. 2012. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **25**, 1617–26.

Li, Z., G. Yi, J. Yin, P. Sun, D. Li, and C. Knight. 2008. Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **21**, 252–261.

Manzanilla, E. G., M. Nofrarías, M. Anguita, M. Castillo, J. F. Perez, S. M. Martín-Orúe, C. Kamel, and J. Gasa. 2006. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* **84**, 2743.

Manzanilla, E. G., J. F. Perez, M. Martin, C. Kamel, F. Baucells, and J. Gasa. 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* **82**, 3210–8.

McCracken, V. J., and R. G. Lorenz. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Microreview. *Cellular Microbiology* **3**, 1–11.

McGhee, J.R., Lamm, M.E., and Strober, W. (1999) *Mucosal immune responses: an overview*. Pages 485-506 in *Mucosal Immunology*. P.L. Ogra, ed. Academic Press. San Diego, United States.

McLamb, B. L., A. J. Gibson, E. L. Overman, C. Stahl, and A. J. Moeser. 2013. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. C. Kanellopoulos-Langevin, editor. *PLoS One* **8**, e59838.

Mourão, J. L., V. Pinheiro, A. Alves, C. M. Guedes, L. Pinto, M. J. Saavedra, P. Spring, and A. Kocher. 2006. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. *Animal Feed Science and*

*Technology* **126**, 107–120.

Nabuurs, M. J. A., A. Hoogendoorn, E. J. Van Der Molen, and A. L. M. Van Osta. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Research in Veterinary Science* **55**, 78–84.

Namkung, H., M. Li, J. Gong, H. Yu, M. Cottrill, and C. F. M. de Lange. 2004. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science* **84**, 697–704.

Nofrarías, M., E. G. Manzanilla, J. Pujols, X. Gibert, N. Majó, J. Segalés, and J. Gasa. 2006. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* **84**, 2735–2742.

Omonijo, F. A., L. Ni, J. Gong, Q. Wang, L. Lahaye, and C. Yang. 2017. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 1–11.

Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti, and R. R. Marquardt. 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* **81**, 1790–1798.

Partanen, K. H., and Z. Mroz. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews* **12**, 117.

Partanen, K., H. Siljander-Rasi, J. Pentikäinen, S. Pelkonen, and M. Fossi. 2007. Effects of weaning age and formic acid-based feed additives on pigs from weaning to slaughter. *Archives of Animal Nutrition* **61**, 336–356.

van der Peet-Schwering, C. M. C., A. J. M. Jansman, H. Smidt, and I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs<sup>1,2</sup>. *Journal of Animal Science* **85**, 3099–3109.

Phillips, I. 2003. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**, 28–52.

Pinho-Ribeiro, F. A., M. S. N. Hohmann, S. M. Borghi, A. C. Zarpelon, C. F. S. Guazelli, M. F. Manchope, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-κB. *Chemico-Biological Interactions* **228**, 88–99.

Platel, K., and K. Srinivasan. 2004. Digestive stimulant action of spices: a myth or reality? *The Indian journal of medical research* **119**, 167–79.

Pluske, J. R., D. J. Hampson, and I. H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* **51**, 215–236.

Pluske, J. R., I. H. Williams, and F. X. Aherne. 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Animal Science* **62**, 131–144.

Putala, H., P. Nurminen, and K. Tiihonen. 2017. Effects of cinnamaldehyde and thymol on cytotoxicity, tight junction barrier resistance, and cyclooxygenase-1 and -2 expression in Caco-2 cells. *Journal of Animal and Feed Sciences* **26**, 274–284.

Rahman, I., A. Kode, and S. K. Biswas. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* **1**, 3159–3165.

Rhouma, M., F. Beaudry, W. Thériault, N. Bergeron, S. Laurent-Lewandowski, J. M. Fairbrother, and A. Letellier. 2015. Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149: F4 (K88). *Res. Vet. Sci.* **102**:173–181.

Rhouma, M., J. M. Fairbrother, F. Beaudry, and A. Letellier. 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica* **59**, 31.

Rothkötter, H. J., H. Ulbrich, and R. Pabst. 1991. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Research in Veterinary Science* **29**, 237–242.

Schwarz, S., C. Kehrenberg, and T. R. Walsh. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**, 431–437.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* **25**, 192–205.

Sharma, R., U. Schumacher, V. Ronaasen, and M. Coates. 1995. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* **36**, 209–14.

Suiryanrayna, M. V. A. N., and J. V Ramana. 2015. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **6**, 45.

Sun, J., X.-L. Hu, G.-W. Le, and Y.-H. Shi. 2010. Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation. *Letters in Applied Microbiology* **50**, 264–269.

Tan, C., H. Wei, H. Sun, J. Ao, G. Long, S. Jiang, and J. Peng. 2015. Effects of dietary supplementation of oregano essential oil to sows on oxidative stress status, lactation feed intake of sows, and piglet performance. *BioMed Research International* **2015**, 1–9.

Thacker, P. A. 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **4**, 35.

Topping, D. L., and P. M. Clifton. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic

function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* **81**, 1031–1064.

Tsiloyiannis, V. K., S. C. Kyriakis, J. Vlemmas, and K. Sarris. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science* **70**, 287–293.

Utiyama, C., L. Oetting, P. Giani, and U. Ruiz. 2006. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarréia eo desempenho de leitões recém. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 2359–2367.

Wei, H.-K., H.-X. Xue, Z. X. Zhou, and J. Peng. 2017. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal* **11**, 193–201.

Willing, B. P., and A. G. Van Kessel. 2007. Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. *Journal of Animal Science* **85**, 3256–3266.

Windisch, W., K. Schedle, C. Plitzner, and A. Kroismayr. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry 1. *Journal of Animal Science* **86**, 140–148.

Xu, C. C., S. F. Yang, L. H. Zhu, X. Cai, Y. S. Sheng, S. W. Zhu, and J. X. Xu. 2014. Regulation of N-acetyl cysteine on gut redox status and major microbiota in weaned piglets. *Journal of Animal Science* **92**, 1504–1511.

Xu, Y. T., L. Liu, S. F. Long, L. Pan, and X. S. Piao. 2018. Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology* **235**, 110–119.

Yan, L., J. P. Wang, H. J. Kim, Q. W. Meng, X. Ao, S. M. Hong, and I. H. Kim. 2010. Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. *Livestock Science* **128**, 115–122.

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

**Table 1.** Centesimal and nutritional composition of the experimental diets.

<b>Ingredients (%)</b>	<b>Pre-starter II</b>	<b>Starter I</b>
Corn	39,94	47,70
Soybean meal	20,06	27,30
Maxi piglets <sup>1</sup>	40,00	0,00
Maxi piglets <sup>2</sup>	0,00	25,00
Total	100,00	100,00
<b>Nutritional levels</b>		
Protein (%)	19,00	19,00
Fat (%)	4,59	3,52
Calcium (%)	0,91	1,00
Phosphorus available (%)	0,46	0,48
Metabolizable energy (Kcal/kg)	3403	3310
Digestible Lysine (%)	1,45	1,35
Digestible Methionine+ Cysteine (%)	0,81	0,75
Digestible Threonine (%)	0,97	0,90
Digestible Tryptophan (%)	0,28	0,26
Total Lactose (%)	9,85	5,11
Mineral matter (%)	6,45	6,62

<sup>1</sup> Levels of guarantee per kg of product Maxi piglets used in the pre-start ration II: Humidity (max) 100.00 g; Crude Protein (min) 154.00 g; Ethereal Extract (min) 73.00 g; Gross Fiber (max) 50.00 g; Mineral Matter (max.) 300.00 g; Calcium (min / max) 16.00 / 24.00 g; Sodium (min) 8,000.00 mg; Phosphorus (min) 10.00 g; Lysine (min) 24.00 g; Methionine (min) 7,800.00 mg; Threonine (min) 15.00 g; Tryptophan (min) 3,300.00 mg; Cobalt (min) 2.00 mg; Iron (min) 142.00 mg; Iodine (min) 2.00 mg; Manganese (min) 100.00 mg; Selenium (min) 1.00 mg; Folic Acid (min) 9.00 mg; Choline (min) 1.225,00 mg; Niacin (min) 95.00 mg; Calcium Pantothenate (min) 31.00 mg; Vitamin A (min) 32,000.00 IU; Vitamin B1 (min.) 6.00 mg; Vitamin B12 (min) 96.00 mcg; Vitamin B2 (min) 19.00 mg; Vitamin B6 (min) 9.00 mg; Vitamin D3 (min) 6,400.00 IU; Vitamin E (min) 160.00 IU; Vitamin H (min) 0.60 mg; Vitamin K (min) 6.00 mg. Main Ingredients: Biscuit Bran (27%), Whole Soybean Extract (9%), Plasma (5%), Bicalcic Phosphate (3%), Calcitic calcary (2%), Common Salt ), Whey (33%), Milk powder (4%).

<sup>2</sup> Levels of guarantee per kg of product Maxi piglets used in the start ration I: Humidity (max) 100.00 g; Crude Protein (min) 84.00 g; Ethereal Extract (min) 63.00 g; Gross Fiber (max) 50.00 g; Mineral Matter (max.) 300.00 g; Calcium (min / max) 28.00 / 44.00 g; Phosphorus (min) 15.00 g; Sodium (min) 11.00 g; Lysine (min) 20.00 g; Methionine (min) 4,900.00 mg; Threonine (min) 10.00 g; Cobalt (min) 5.00 mg; Iron (min) 251.00 mg; Iodine (min) 5.00 mg; Manganese (min) 200.00 mg; Selenium (min) 2.00 mg; Folic Acid (min) 3.00 mg; Choline (min) 2,672.00 mg; Niacin (min) 129.00 mg; Calcium Pantothenate (min) 60.00 mg; Vitamin A (min) 38,000.00 IU; Vitamin B1 (min.) 8.00 mg; Vitamin B12 (min) 129.00 mcg; Vitamin B2 (min) 25.00 mg; Vitamin B6 (min) 12.00 mg; Vitamin D3 (min) 9,000.00 IU; Vitamin E (min) 807.00 IU; Vitamin H (min) 0.50 mg; Vitamin K (min) 9.00 mg. Main ingredients: Biscuit Bran (33%), Bicalcic Phosphate (7%), Calcitic calcary (4%), Common Salt (2%), Sugar (19%), Whey (29%).

**Table 2.** Establishment of a lesion score – endpoints used to assess histological lesions.

<b>Tissue</b>	<b>Type of lesions (severity factor)</b>	<b>Maximal score</b>
<b>Small intestine (Jejunum and Ileum)</b>	Lymphatic vessel dilation (1)	42
	Cell vacuolation (1)	
	Cubic enterocytes (2)	
	Villus flattening (2)	
	Villus fusion (1)	
	Interstitial oedema (2)	
	Bacterial adherence (2)	
	Villi apical necrosis (3)	

**Table 3.** Effects on the mean number of mitotic figures on intestinal crypts of pigs submitted to different treatments.

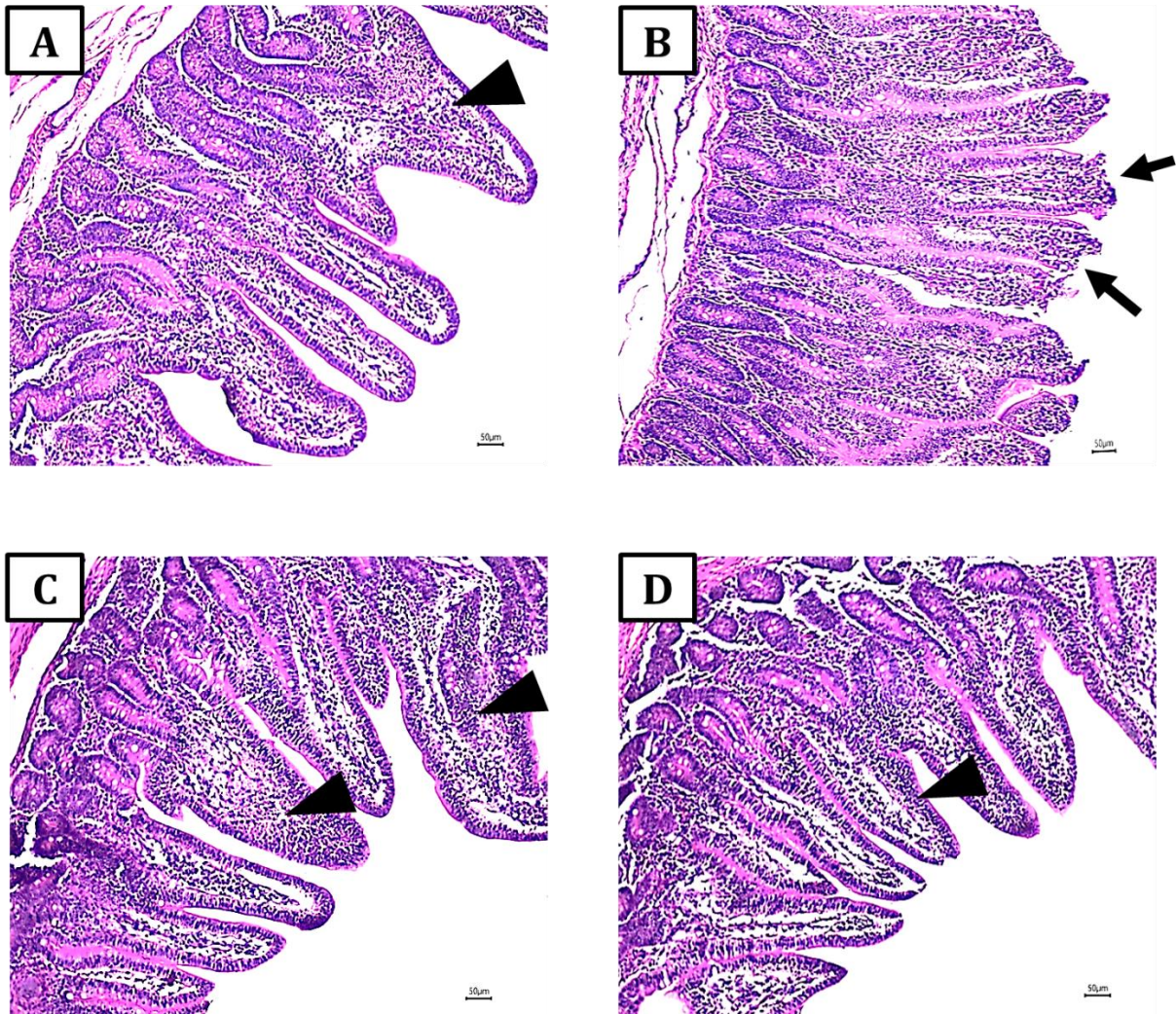
	<b>Mean number of mitosis figures</b>	
	<b>Jejunum</b>	<b>Ileum</b>
<b>Control</b>	3.50±0.47 <sup>c</sup>	4.20±0.49 <sup>a</sup>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	4.53±0.52 <sup>ab</sup>	4.57±0.34 <sup>a</sup>
<b>Colistin + <i>E.coli</i></b>	4.30±0.37 <sup>b</sup>	4.40±0.44 <sup>a</sup>
<b>Commercial blend (1kg) + <i>E.coli</i> (CB1)</b>	4.80±0.40 <sup>ab</sup>	4.73±0.37 <sup>a</sup>
<b>Commercial blend (2kg) + <i>E.coli</i> (CB2)</b>	5.10±0.49 <sup>a</sup>	4.93±0.48 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean ± SE. Different superscripts in the same column mean a significant difference by Tukey test (a > b > c,  $P < 0.05$ ).

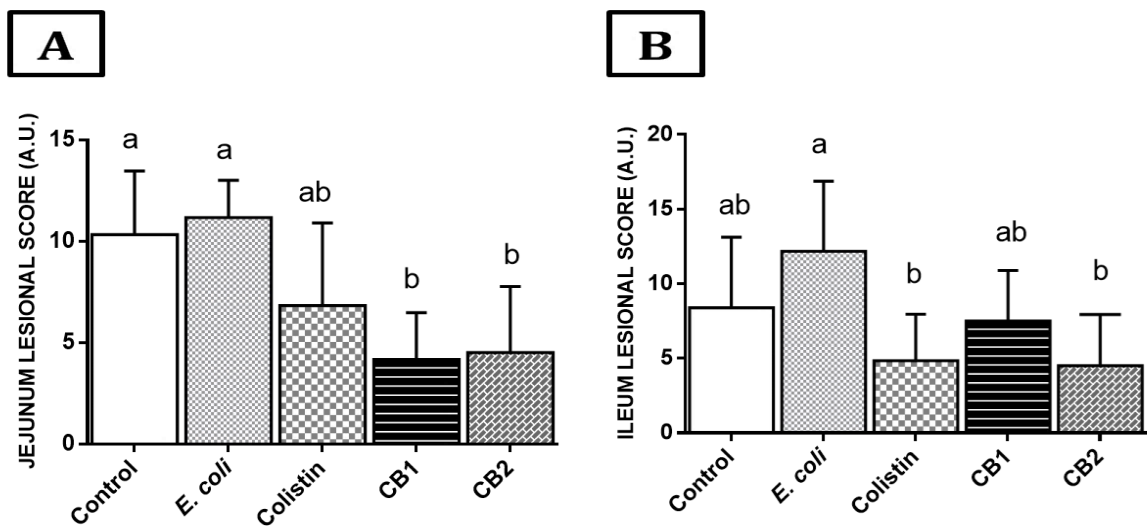
**Table 4.** Redox status in tissues from piglets fed experimental diets.

Treatments	GSH		FRAP		ABTS		TBARS		NBT	
	(nmol/mg protein)		(nmol of TROLOX Eq/mg protein)		(nmol of TROLOX Eq/mg protein)		(OD 535-572/mg protein)		(OD/mg protein)	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
<b>Control</b>	31.38 <sup>ab</sup>	50.09 <sup>c</sup>	71.90 <sup>a</sup>	81.06 <sup>c</sup>	278.1 <sup>a</sup>	341.4 <sup>b</sup>	0.77 <sup>b</sup>	0.77 <sup>b</sup>	10.01 <sup>a</sup>	11.00 <sup>ab</sup>
	±1.91	±7.72	±9.18	±6.48	±74.3	±29.8	±0.25	±0.15	±1.05	±1.06
<b><i>Escherichia coli</i></b>	33.37 <sup>ab</sup>	54.07 <sup>c</sup>	76.19 <sup>a</sup>	85.54 <sup>c</sup>	238.0 <sup>ab</sup>	404.2 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	1.35 <sup>a</sup>	9.18 <sup>ab</sup>	11.83 <sup>a</sup>
	±2.62	±5.7	±6.85	±10.95	±32.4	±28.61	±0.45	±0.36	±0.60	±2.39
<b>Colistin + <i>E.coli</i></b>	31.32 <sup>b</sup>	86.29 <sup>b</sup>	66.01 <sup>a</sup>	104.00 <sup>ab</sup>	196.6 <sup>b</sup>	354.6 <sup>ab</sup>	0.70 <sup>b</sup>	0.57 <sup>b</sup>	8.11 <sup>b</sup>	9.81 <sup>ab</sup>
	±2.69	±9.8	±10.5	±7.55	±30.1	±38.3	±0.10	±0.11	±1.14	±1.3
<b>Commercial blend</b>	34.26 <sup>ab</sup>	75.86 <sup>b</sup>	65.69 <sup>a</sup>	89.64 <sup>bc</sup>	239.7 <sup>ab</sup>	319.4 <sup>b</sup>	0.95 <sup>ab</sup>	0.74 <sup>b</sup>	8.14 <sup>b</sup>	10.04 <sup>ab</sup>
<b>(1kg) + <i>E.coli</i> (CB1)</b>	±2.99	±3.27	±7.57	±15.34	±25.6	±43.1	±0.27	±0.28	±1.13	±1.43
<b>Commercial blend</b>	36.22 <sup>a</sup>	102.3 <sup>a</sup>	72.03 <sup>a</sup>	111.80 <sup>a</sup>	226.3 <sup>ab</sup>	374.1 <sup>ab</sup>	0.82 <sup>b</sup>	0.72 <sup>b</sup>	8.04 <sup>b</sup>	8.83 <sup>b</sup>
<b>(2kg) + <i>E.coli</i> (CB2)</b>	±2.34	±10.2	±12.1	±6.26	±22.1	±26.2	±0.24	±0.20	±0.69	±1.15

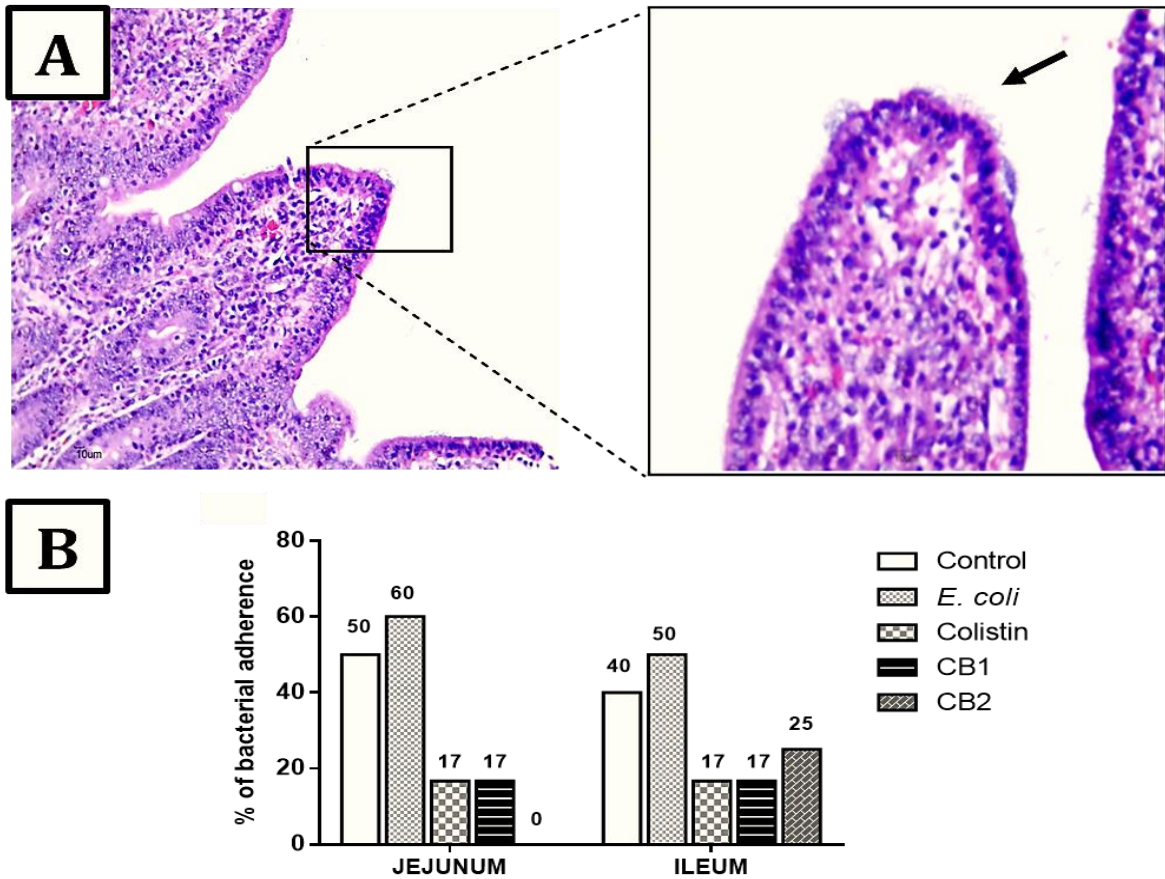
Values are expressed as mean ± SE. Different superscripts in the same column mean a significant difference by Tukey test (a > b > c,  $P < 0.05$ ).



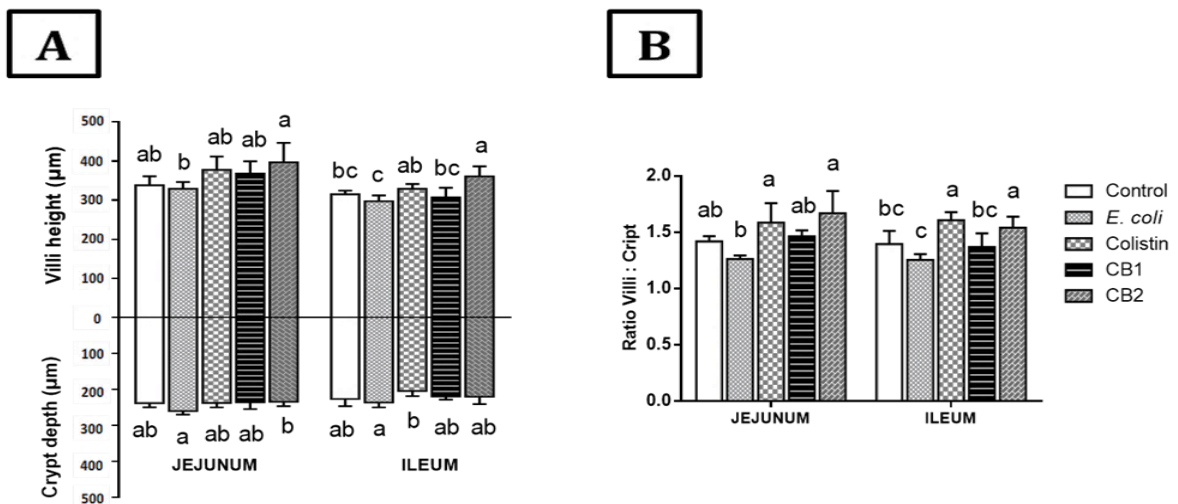
**Fig. 1.** Jejunum of piglets submitted to different treatments. (A) Control piglet with mild villi fusion (arrow head), HE, 20 $\times$ ; (B) *E. coli* group with villi apical necrosis (arrow), HE, 20 $\times$ ; (C-D) Colistin and Commercial blend 2 (CB2) group with preserved morphology with mild villus fusion (arrow head), HE, 20 $\times$ .



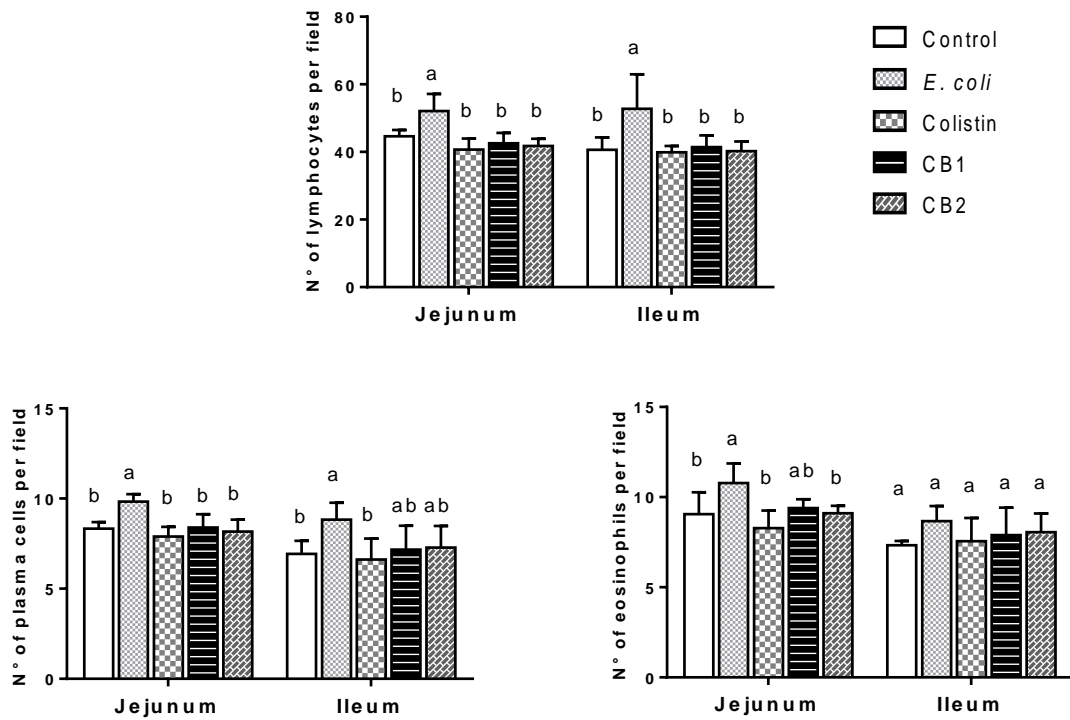
**Fig. 2.** Effects of different treatments on the lesional score in the jejunum and ileum of piglets. Values are means (arbitrary units) with standard errors of the mean ( $\pm$  SE) represented by vertical bars ( $n=6$  animals). <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different ( $P<0.05$ ).



**Fig. 3.** Effects of colistin and commercial blend (CB1-2) on intestinal bacterial adhesion. Jejunum of *E. coli* group piglet with bacterial adhesion (arrow), HE, 20-40x (A). Percentage of intestinal bacterial adhesion in the different treatments (B).



**Fig. 4.** Effects of colistin and commercial blend on jejunum and ileum villi height and crypt depth. Pigs received a basal diet free of challenge (control) or a basal diet challenged without additives (*Escherichia coli*) or a basal diet supplemented challenged with 200 mg/kg of colistin (Colistin) or basal diet challenged with 1 kg commercial blend /ton or (CB1) or basal diet with 2 kg commercial blend/ ton (CB2). Values are means height and depth (µm) with their standard errors of the mean (± SE) represented by vertical bars (n=6 animals).<sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different (P<0.05).



**Fig. 5.** Effects on the number of inflammatory cells in the lamina propria of the jejunum and ileum of pigs fed with basal diet free of challenge (Control) and basal diets challenged: basal diet without additives (*E. coli*), basal diet supplemented with 200 mg/kg of colistin (Colistin), basal diet with 1 kg commercial blend/ton (CB1), and basal diet with 2 kg commercial blend/ ton (CB2). Values are mean numbers of inflammatory cells per field ( $1.5 \text{ mm}^2$ ;  $n=6$  animals), with standard errors of the mean ( $\pm$  SE) represented by vertical bars. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different ( $P<0.05$ ).

## 5. ARTIGO B

### SYSTEMIC EFFECTS OF A BLEND OF ORGANIC ACIDS AND CINNAMON ESSENTIAL OIL IN PIGLETS EXPOSED TO ENTEROTOXIC *Escherichia coli* (ETEC)

**ABSTRACT** – Organic acids and essential oils have been used in feeding pigs due to their beneficial effects on performance, intestinal morphology, and intestinal infections. However, few studies have evaluated the systemic effect of the combination of organic acids and essential oils. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of a commercial blend (CB) of organic acids and cinnamon essential oil on tissue homeostasis of piglets exposed to challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. A total of 30 21-days-old weaned piglets with initial body weight of  $6.06 \pm 0.25$  kg were used in an experiment that lasted 19 days. All pigs were subjected for seven days to a basal diet and then were allotted to five dietary treatments in a randomized design, using 6 replications per treatment. The treatments consisted of 1) control, basal diet free of challenge and challenged treatments: 2) *Escherichia coli*, basal diet without additives; 3) colistin, basal diet supplemented with 200 mg/kg of colistin; 4) CB1, basal diet with 1 kg commercial blend/ton; and 5) CB2, basal diet with 2 kg commercial blend/ ton. Seven days after the start of the treatments the animals were challenged with 5ml ( $1,1 \times 10^9$  CFU/mL) of an enterotoxigenic strain of *E. coli* (K88). Five days later, all animals were euthanized for sampling of liver, mesenteric lymph node, spleen, kidney and lung for histological analysis. The histological sections were analyzed to determine the lesion score, which was calculated by considering the degree of severity and the extent of each lesion. Liver samples were also collected to determine the antioxidant capacity and oxidative response by spectrophotometric assays. Antioxidant capacity was determined by the reduced glutathione (GSH), ferric-reducing ability potential (FRAP) and free-radical scavenging ability (ABTS) assays, while the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and nitroblue tetrazolium reduction (NBT) assays were used to determine the oxidative response. The means of the data were submitted to statistical analysis (ANOVA and Tukey's test) considering  $P \leq 0.05$ . The animals that received the commercial blend (CB 1-2) showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ) on histological changes in the liver, mesenteric lymph node and spleen when compared to the *E. coli* group. No marked histological changes were observed in the kidneys and lungs. The *E. coli* challenge produced a significant increase in the lesion score in the liver and mesenteric lymph node, as well as causing hepatic oxidative damage. CB2 supplementation induced a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in superoxide anion (NBT) levels and a decrease ( $P < 0.05$ ) in TBARS concentration in the liver compared to the *E. coli* group. The GSH levels remained unchanged, however, a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the FRAP levels was observed in these animals (CB2) when compared to the colistin group and a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in ABTS levels in relation to the *E. coli* group. These data show that the inclusion of the commercial blend of organic acids and cinnamon essential oil (CB1-2) in the diet protects tissues (liver and lymph node) against damage caused by bacterial challenge.

**Key-words:** Liver, Spleen, Mesenteric Lymph Node, Colistin, Oxidative Stress.

#### 1. Introduction

Weaning is a stressful and complex event, characterized by changes in diet and social and environmental conditions, which profoundly affects piglet health and leads to declined performance and, in many cases mortality (Le Dividich and Sève, 2000). These diverse factors have critical consequences on piglet behavior and the physiology of their immature gastrointestinal tract (GIT) (Lallès et al., 2007). Among the main gastrointestinal changes that have been associated with weaning are the small intestine atrophy and reduced villous height, decrease in fluid, nutrient and electrolyte absorption, increase of permeability to antigens and toxins, and modifications in intestinal microbiota (Montagne et al., 2007). These changes can be involved in the etiology of post-weaning diarrhea (PWD) and other enteric infections (Pluske et al., 1997). The main infectious agent of post-weaning diarrhea in piglets is enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), being responsible for the death of weaned pigs (Francis, 2002).

Antibiotics have long been added to starter pig diets to combat diarrhea problems and enhance growth performance (Kyriakis et al., 1999). Colistin, a polymyxin antibiotic with an activity against gram-negative bacteria is widely used for the control of PWD in pigs (Kempf et al., 2013). However, given the increase in public health concerns about the propagation of multiresistant bacteria, there is an urgent necessity for developing non-antibiotic alternative strategies to control infections associated with weaning, maintaining at the same time, piglets productivity (Rhouma et al., 2017). Several alternatives to antibiotics have been proposed to overcome diarrhea problems at weaning (Seal et al., 2013). Within this group and depending on its action potential, organic acids and essential oils could be relevant alternatives to develop an antibiotic-free feeding strategy (Thacker, 2013).

Organic acids (OA) such as formic, propionic, benzoic, fumaric, lactic, and citric acids present bacteriostatic and bactericidal properties and have been used in elevated dose in piglet diet (Suiryanrayna and Ramana, 2015). Its antimicrobial activity is mainly given by depression of the pH of the diet and the digestive tract, creating a hostile environment for coliforms bacteria survival (Namkung et al., 2004) and a promising medium for lactic bacteria (Gong et al., 2008). In addition, due to the ability of its undissociated form to penetrate the cell wall of bacteria and disrupt normal physiology makes them effective antimicrobial agents (G. Papatsiros and Billinis,

2012). Addition of OA or their salts to weaned pig diets have been shown to improved growth performance (Partanen et al., 2007; Braz et al., 2011), gastrointestinal health (Heo et al., 2013), and reduction in the incidence and severity of diarrhea (Tsiloyiannis et al., 2001). It has been reported that the use of OA in the feed reduces the the concentration of hydroxyl radicals in serum of weaned piglets (Long et al., 2018). Moreover, OA could promote the development of intestinal morphology in weaned piglets by reducing the digesta pH values and maintaining the microbiota balance (Diao et al., 2014).

Plants produce many secondary metabolites or phytochemicals, which are important for the correct functioning of the plant. Plants use most of these compounds as a defense mechanism against microorganisms, and other predators (Sultanbawa, 2011). Essential oils (EO), terpenoids, phenolic compounds, polypeptides, alkaloids, and polyacetylenes are the main phytochemicals present in plants (Cowan, 1999). EO also called volatile are a complex mixture of natural compounds obtained from aromatic plants by various processes, but the method most used commercially is steam distillation (Burt, 2004). EO have two main classes of compounds, terpenes (eg, thymol and carvacrol) and phenylpropenes (eg, eugenol and cinnamaldehyde) (Omonijo et al., 2017). It has been recognized that EO have antimicrobial, antiviral, antimycotic, antitoxigenic, antiparasitic, anti-inflammatory, antioxidative and insecticidal properties (Burt, 2004; Reichling et al., 2009; Omonijo et al., 2017). The antibacterial property of essential oils and their components is mainly given by their hydrophobicity, which allows them to divide in the lipids of the bacterial cell membrane and making it more permeable, leading to death (Burt, 2004). Several studies have shown the beneficial effects of EO on the performance of poultry and pigs (Zeng et al., 2015), as well as antioxidant effects (Amorati et al., 2013).

Recently, some reports have indicated that the addition of a combination of OA and EO in the diet of weaned piglets provides a possible synergistic effect, especially on productive performance (Cho and Kim, 2015; Xu et al., 2018). These studies focused mainly on performance, digestibility of nutrients, digestive enzymes activity, and intestinal morphology; in summary, on intestinal health. There are no studies in weaned piglets that evaluating the effects of the combination of OA and EO on other organs, especially in immunologically challenged piglets. Therefore, this experiment was

conducted to evaluate the systemic effects of a blend of organic acids and cinnamon essential oil on piglets exposed to a challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design and diets

Twenty-one-day-old piglets (n=30, half females and half-castrated males) with an average weight of 6.06 kg (SD 0.25) were housed in pens with nipple drinkers, linear feeders, partially slatted floor and environmental temperature controlled by the infrared lamps and by the curtains management. Throughout the trial, the piglets received three rations (Table 1), formulated to meet the minimum requirements, being defined as follows: pre-initial II (28 – 38 days old), initial I (39 – 40 days old). The animals were fed *ad libitum* as dry meal. During the first seven days, they received a standard diet. Then, the piglets were randomly divided and subjected to one of five dietary treatments (6 replicates per treatment) for 12 days. The dietary treatments were 1) control, basal diet free of challenge and challenged treatments; 2) *Escherichia coli*, basal diet without additives + *E. coli*; 3) colistin, basal diet supplemented with 200 ppm of colistin + *E. coli*; 4) CB1, basal diet with 1 kg commercial blend/ton + *E. coli*; and 5) CB2, basal diet with 2 kg commercial blend/ ton + *E. coli*. One kilogram the commercial blend ensured inclusion in the diet of 1.8% of formic acid, 0.9% of acetic acid, 0.45% of propionic acid, 0.35% of fumaric acid and 0.04% of cinnamon essential oil. Seven days after starting the treatment, the animals of all groups except the control group received in the oral cavity 5 mL of a bacterial suspension ( $1,1 \times 10^9$  CFU/mL) of enterotoxigenic strain of *E. coli* K88:LT (rNal, rRif). Five days after the bacterial challenge, the animals were stunned using electric current provided by a device (Petrovina® IS 2000) with two electrodes and then exsanguinated. Samples of liver, mesenteric lymph node, spleen, kidney and lung were collected for histological analysis and determination of lesional score. Liver samples and frozen at -80°C were also collected for analysis of the oxidative stress response. This investigation was approved by the Ethics Committee on the use of animals of the State University of Londrina, CEUA Protocol number 13812.2017.19

### 2.2. Preparation of the inoculum and inoculation

The ETEC strains were originally obtained from the bacteria bank of the Avian Medicine Laboratory of the Universidade Estadual de Londrina. The strains were isolated from clinical cases of piglets with post-weaning diarrhea. The inoculum was produced in several steps as previously described (Daudelin et al., 2011), which were: (i) induction of resistance in isolates of *E. coli* (K88ab; K88; 987p; paa) to rifampicin (Rif) and nalidixic acid (Nal); (ii) incubating the resistant ETECs in BHI broth at 37°C for 24h and then a pool formed before inoculation; and (iii) determination of viable ETEC numbers by serial dilution and plate count on McConkey agar (100 µg/mL Nal/Rif). Seven days after the starting of the treatment, the piglets received a single oral administration of 5 ml of ETEC inoculum ( $1.1 \times 10^9$  CFU/mL). After the inoculum, to rise bacterial survival in the stomach and to provide a safe passage from the inoculum to the small intestine the animals received 10mL of CaCO<sub>3</sub> (Rhouma et al., 2015).

### *2.3. Histological assessment*

After the euthanasia, samples of liver, kidney, lung, spleen and mesenteric lymph nodes were fixed in a 10% buffered formalin solution. The tissue fragments fixed in formalin 10% were dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Sections of 5 µm were stained with haematoxylin–eosin for histopathological evaluation. A lesional score was designed to compare histological changes. As shown in Table 2, histopathological analysis led to the identification of different lesions and allowed to establish a lesional score *per* animal. Based on two adapted method as previously published (Gerez et al., 2015; Grenier et al., 2011), the lesional score was calculated considering the degree of severity (severity factor) and the extent of each lesion (intensity or observed frequency, scored from 0 to 3). For each lesion, the score of the extent was multiplied by the severity factor. The tissue score was then obtained by the sum of each lesion score. For each tissue, the minimal score was 0 and the maximal lesional score was 36 for spleen, 33 for liver, kidney and lymph nodes, and 21 for lung (Table 2). The means of lesional score were utilized for statistical analysis.

### *2.4. Determination of antioxidant capacity by the reduced glutathione (GSH), ferric-reducing ability potential (FRAP) and free-radical scavenging ability (ABTS) assays*

The GSH assay is a spectrophotometric method that measures glutathione levels in tissue samples. This assay is based on the reaction of glutathione (GSH) with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form the yellow derivative 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) (Rahman et al., 2007). The rate of formation of TNB is proportional to the concentration of GSH in the sample. The tissues were processed following an adapted method described previously (Sedlak and Lindsay, 1968). The frozen liver samples were homogenized in cold EDTA (0.02M). The homogenate was treated with trichloroacetic acid (50% w/v) and centrifuged (1,500 ×g, 15min). After centrifugation, Tris-HCl (0.4 M, pH 8.9) and DNTB (10mM) were added to the supernatant and the samples were vortex-mixed. The absorbances of the samples are read at 412 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland), after 5 min. Using different concentrations of GSH and other reagents mentioned above, a standard curve was prepared. The results were presented as mmols of GSH/milligrams of protein.

The frozen tissues were processed and homogenized with KCl (500 µL, 1.15%), and then centrifuged (200 ×g, 10min, 4 ° C). The resulting supernatants were used to evaluate the total antioxidant capacity by FRAP and ABTS assays (Pinho-Ribeiro et al., 2015). The FRAP procedure is an automated test measuring the ferric reducing ability of plasma, and it is presented as a widely used method for assessing “antioxidant power” (Antolovich et al., 2002). For the FRAP assay, 15 µL of supernatant was mixed with deionized water (45 µL) and newly prepared FRAP reagent (200 µL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Then, the reaction mix was incubated for 30 minutes at 37 °C, and the absorbance was measured at 595 nm. (Multiskan GO, Thermo Scientific).

The ABTS procedure was performed according to a previously described method and it is based on the capacity of the antioxidants molecules to decrease the ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) (Hohmann et al., 2013). For the ABTS assay, the ABTS<sup>•+</sup> solution (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, USA) was diluted with phosphate buffer saline at pH 7.4 to reach an absorbance of 0.80 at 730 nm. Subsequently, 200 µl of diluted ABTS solution was mixed with 15 µl of the supernatant. The absorbance was measured after 6 min at 730 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). A standard curve was prepared using different concentrations of Trolox (1.5–30 µmol/L, final

concentrations) to compare the results of both assays. The protein levels in the samples were used for data normalization, and the results were expressed as nmol of Trolox equivalent/milligrams of protein.

### *2.5. Determination of the oxidative response by nitroblue tetrazolium (NBT) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assays*

The NBT reduction (Amresco, Solon, OH, USA) was used to determine the production of anion super oxide (Fattori et al., 2015). The samples were homogenized with 1.15% KCl (500  $\mu$ L). Then, aliquots of 50  $\mu$ L of homogenate were transferred to a 96-well plate, followed by the addition of 100  $\mu$ L of NBT solution (1 mg/mL), and incubated in a warm bath for 1 h at 37°C. The supernatant was removed and the reduced formazan solubilized by adding of 2M KOH (120  $\mu$ L) and of dimethyl sulfoxide (140  $\mu$ L) (DMSO). Microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 600 nm measured the optical density. The protein levels in the samples were used for data normalization, thus the results were expressed as NBT reduction (optical density [OD]/milligram of protein).

Hepatic lipid peroxidation was assessed by determining TBARS levels using an adapted method (Hohmann et al., 2013). TBARS method measures Malondialdehyde (MDA) an intermediate product of lipid peroxidation (Antolovich et al., 2002). For TBARS assay, frozen samples were homogenized as described above. To precipitate protein, the homogenate was treated with freshly prepared trichloroacetic acid (10%) and thiobarbituric acid (0.67%) followed by centrifugation (1,000  $\times$ g, 3min, 4°C). The mixture was kept for 15 min in a boiling water bath (100°C) and then the supernatant was removed to determine MDA. MDA was measured by the difference between absorbances at 535 and 572 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). The results were expressed as TBARS (OD A535-A572/mg of protein).

### *2.6. Statistical analysis*

The results were presented as mean  $\pm$  standard deviation. They were analyzed for homogeneity of variances (Bartlett's test) and residue normality (Shapiro test). Then, analysis of variance (ANOVA) was applied followed by a test for multiple

comparisons (Tukey test). Data were analyzed using the statistical software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A probability level of  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. *Effects of colistin and commercial blend on the liver*

In the liver, a significant increase (3 fold,  $P < 0.001$ ) in the lesional score was observed in pigs receiving only the bacterial inoculum (*E. coli* group) compared to the other groups (Figure 1A.). The main histological changes were vacuolization of hepatocytes and lymphocytic infiltrate (Figure 1B-D.).

#### 3.2. *Effects of colistin and commercial blend on the mesenteric lymph nodes and the spleen*

In the mesenteric lymph nodes, a significant decrease ( $P < 0.001$ ) in the lesional score was observed in the groups that received the additives compared to animals of *E. coli* group (Figure 2A.). Changes were verified in all groups, macrophage activation in medullary sinuses (Figure 2B-D.) and subcapsular eosinophilic infiltrate are among the main histological changes. In the spleen, a significant decrease in the lesional score was in the pigs that received the commercial blend (CB2) when compared to the control, *E. coli* and colistin groups ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$  and  $P < 0.05$ , respectively) (Figure 3A.). A significant increase ( $P < 0.001$ ) was observed in the piglets of CB1 group in relation to the *E. coli* group. Animals exposed to colistin had no effect compared to *E. coli* group. The main findings were hyperplasia of lymphoid follicles in both control and *E. coli* groups (Figure 3B.). Mild neutrophil infiltrate was observed in all groups.

#### 3.3. *Effects of colistin and commercial blend on the kidney*

In the kidney, there were no significant differences between the groups on the lesional score (Figure 4A.). Discrete changes were verified in all groups. The main histological changes were cytoplasmic vacuolization of tubular cells and congestion. Cytoplasmic vacuolization was slightly more accentuated in the colistin group (Figure 4B-D.).

### 3.4. Effects of colistin and commercial blend on the lung

In the lung, no significant difference was observed between the groups. Interstitial pneumonia and slight intra-alveolar edema were the main histological changes observed in all groups, being more accentuated in the *E. coli* group. Another histological change frequently observed was vascular congestion (Figure 5).

### 3.5. Antioxidant capacity and oxidative stress in liver of piglets fed the experimental diets

Significant reductions of TBARS, NBT and ABTS ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.0001$  and  $P < 0.01$ , respectively) were observed in the animals that received the commercial mixture (CB2) compared to the *E. coli* group. CB1 supplementation also significantly decreased the TBARS and NBT levels ( $P < 0.05$  and  $P < 0.0001$ , respectively) when compared to *E. coli* group. The levels of GSH remained unchanged. In addition, the liver of animals fed CB2 diet showed a significant increase ( $P < 0.01$ ) of FRAP levels when compared to colistin group (Figure 6). Significant increases ( $P < 0.05$ , for both) in the levels of TBARS and NBT were observed in the animals of the *E. coli* group compared to the control group.

## 4. Discussion

The liver as the most important metabolic organ, main detoxification site and primary defense line against microbes and toxins crossing the intestinal barrier, can be injured by immune challenges (Masaki et al., 2004). Although the intestine is the preferential site in which ETEC-induced toxicity develops (Sun and Kim, 2017), ETEC infections also affect liver tissue, probably associated to increased oxidative stress, resulting in structural damage and cellular injury (Deng et al., 2016). These lesions are mainly attributed to lipopolysaccharides (LPS), a major component of the outer membranes of Gram-negative bacteria that can cause tissue damage (Wyns et al., 2015). The liver plays an important physiological role in LPS detoxification (Jirillo et al., 2002). Few reports have explored the relationship between liver injury and ETEC infection (Deng et al., 2016; Gong et al., 2018). In this study, the challenge with ETEC induced hepatic lesions, and were more evident in animals that did not receive additives (*E. coli* group) than in the other treatments. Vacuolization of hepatocytes and lymphocytic infiltrate were the main lesions observed in the liver of pigs exposed to *E.*

*coli*. Ingestion of diets with the commercial blend induced a significant decrease (3 fold) in liver histological changes compared to *E. coli* group, indicating that it may play a positive role in protecting liver tissue in weaning pigs. Several studies in animal models have provided evidence for beneficial effects of oral supplementation of essential oils and organic acids (Manzanilla et al., 2006; Bozkurt et al., 2012). However, until now the effects of these compounds on the liver of weaned piglets submitted to immunological challenge have not been investigated.

Oxidative stress is an important chemical mechanism that leads to damage to cellular macromolecules such as proteins, lipids and DNA (Zhu et al., 2013), which results from the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and the decrease in defense antioxidant (Omonijo et al., 2017). Because the liver is strategically located at the gateway of the portal blood flow draining the GIT, it becomes the final barrier to prevent gastrointestinal bacteria and their products, from entering the systemic bloodstream (Su, 2002). In the present study, we observed that *E. coli* challenge caused hepatic oxidative injury, indicated by an increase in superoxide anion (NBT) and lipid peroxidation (TBARS) levels. Similar results were reported in mice (7–8 weeks old) exposed to ETEC, where an increase in the concentration of TBARS was reported (Deng et al., 2016). In the liver, CB2 supplementation protected against *E.coli*-induced oxidative stress as demonstrated by the significant reduction of NBT and TBARS levels, as well as a slight increase in the antioxidant capacity (ABTS, FRAP and GSH levels). Studies showed that organic acids and essential oils present systemic antioxidant properties, by reducing the concentrations of ROS and TBARS concentrations and the increase of antioxidant enzymes (Tan et al., 2015; Xu et al., 2018). With these data and based on our results, we hypothesized that the inclusion of a combination of these additives in the diet protected the piglets against hepatic oxidative damage induced by the bacterial challenge, mainly through the scavenging of ROS. The antimicrobial effect of organic acids and essential oils could also be responsible for a lower hepatic oxidative injury, due to a decrease in the number of intestinal pathogenic bacteria (Xu et al., 2018), which can cross the intestinal barrier and reach the liver causing damage (Masaki et al., 2004).

In the present study, mild changes were verified in the mesenteric lymph nodes of piglets of all groups, mostly macrophage activation in medullary sinuses and subcapsular eosinophilic infiltrate. However, these changes were more marked in

challenged piglets (*E. coli* group) that did not receive additive supplementation. Increased histological changes in the animals of the *E. coli* group may be due to a rise in the bacterial translocation produced by the *E. coli* challenge (Almeida et al., 2013). When inflammation occurs, as in infections with pathogenic *E. coli* or after weaning, the epithelial barrier and tight junctions functionality are impaired (Grilli et al., 2015; König et al., 2016). This allows bacterial products to cross the intestinal epithelium and enter the lamina propria (Hu et al., 2015), facilitating translocation of damaging substances and pathogens into the body (König et al., 2016). Because the mesenteric lymph nodes receives its lymphatic drainage from the small intestine, it is believed that these lymph nodes should be the major site and pathway of translocated gut-origin LPS (Xia, 2002). This translocation could be, at least in part, a predisposing factor for systemic infection (Alexander et al., 1991). A study showed an increase in bacterial translocation to the mesenteric lymph nodes following *E. coli* challenge in pigs of 45-day-old fed a non-supplemented basal diet (Lessard et al., 2009). In our study, diets supplemented with the commercial blend of organic acids and cinnamon essential oil (CB1-2) induced a decrease (2 fold) in lymph nodes histological changes compared to *E. coli* group, indicating that the administration of the commercial mixture can reduce bacterial translocation to the mesenteric lymph nodes. This may be due to the direct antimicrobial effect of organic acids and essential oils or because of the protective effect of some organic acids on the gut mucosal barrier, through stimuli increase in the production of antimicrobial peptides in mucous (Schauber et al., 2003) and the expression of tight junction proteins (Bordin et al., 2004).

In the spleen, the main findings were hyperplasia of lymphoid follicles in the control and *E. coli* groups, but these finding were more evident in challenged piglets (*E. coli* group). Previous studies on animal models have reported that *E. coli* and lipopolysaccharide (LPS) challenge could cause spleen changes (Nandi et al., 2010; Yu et al., 2017). We have verified a significant decrease on the lesional score in piglets fed the commercial blend (CB1-2) compared to the control and *E. coli* groups. Previous studies have reported that addition of organic acids and essential oils significantly increased the relative weight of the spleen in pigs and poultry (Mohamed et al., 2014; Liu et al., 2017). Heavier spleens may indicate better development of the immune system (Fascina et al., 2017). However, an increase in relative spleen weight may also be associated with hypersensitivity processes in the GIT and stimuli of invasion of the

intestine by opportunistic pathogens, such as enterotoxigenic *E. coli* (Oliveira et al., 2017). To the best of our knowledge, it is the first study to analyze the combined effects of organic acids and essential oils on the splenic morphology of immunologically challenged pigs using an *in vivo* model.

A slight cytoplasmatic vacuolization of tubular cells was the main lesion observed in the kidneys of pigs of all groups. No differences were observed in the kidney between the treatments. It is well known that colistin is frequently used as oral medication in pig production to control colibacillosis (Rhouma et al., 2015). It was shown that colistin at a dose of 200 mg/kg of diet does not produce negative effects in the kidneys, thus confirming the theory that orally administered colistin has a low toxicity (Rhouma et al., 2016). This is because colistin in pigs is characterized by low gastrointestinal absorption (Guyonnet et al., 2010), so the risk of adverse effects associated with systemic exposure to colistin is insignificant.

The histological lesions observed in the lungs of challenged piglets of the *E. coli* group were slightly more pronounced in relation to the other groups. However, the lesional score of the groups did not show significance. Lung lesions observed in all the groups appear to have been caused by the aspiration of small amounts of the liquid during inoculation. Interstitial pneumonia and thickening of the alveolar walls being the main histological changes observed.

## **5. Conclusion**

The results showed that the supplementation of a combination of organic acids and cinnamon essential oil (CB1-2) has a tissue protective effect, especially on the liver and lymphoid organs (spleen and mesenteric lymph node) of weaned piglets challenged with *E. coli*. The results also indicated that the commercial blend is a safe supplement for reducing hepatic oxidative stress. Thereby, the research provides a theoretical basis to support the use of combinations of these additives in the swine industry, not only as enhancers of intestinal health, but also as beneficial to general health.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

Jimenez, M. was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior" (CAPES).

## References

- Alexander, J. W., L. Gianotti, T. Pyles, M. A. Carey, and G. F. Babcock. 1991. Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. *Ann. Surg.* 213:558-66; discussion 566–7.
- Almeida, J. A., Y. Liu, M. Song, J. Lee, H. Gaskins, C. Maddox, O. Osuna, and J. Pettigrew. 2013. *Escherichia coli* challenge and one type of smectite alter intestinal barrier of pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:52.
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L., 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 61:10835–10847.
- Antolovich, M., P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 127:183–198.
- Bordin, M., F. D'Atri, L. Guillemot, and S. Citi. 2004. Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. *Mol. Cancer Res.* 2:692–701.
- Bozkurt, M., K. Küçükyılmaz, A. Çatli, M. Çınar, M. Çabuk, and A. Alçiçek. 2012. Effects of administering an essential oil mixture and an organic acid blend separately and combined to diets on broiler performance. *Arch. für Geflügelkd.* 2:81–87.
- Braz, D. B., L. B. Costa, B. Berenchtein, M. L. P. Tse, V. V. Almeida, and V. S. Miyada. 2011. Acidificantes como alternativa aos antimicrobianos promotores do crescimento de leitões. *Arch. Zootec.* 60:745–756.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223–253.
- Cho, J., and I. Kim. 2015. Effects of microencapsulated organic acids and essential oils on growth performance and intestinal flora in weanling pigs. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* 28:229–237.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564–82.
- Daudelin, J.-F., M. Lessard, F. Beaudoin, É. Nadeau, N. Bissonnette, Y. Boutin, J.-P. Brousseau, K. Lauzon, and J. Fairbrother. 2011. Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Vet. Res.* 42:69.
- Deng, Y., W. Xiao, L. Chen, Q. Liu, Z. Liu, and Z. Gong. 2016. In vivo antioxidative effects of l-theanine in the presence or absence of *Escherichia coli*-induced oxidative stress. *J. Funct. Foods.* 24:527–536.
- Diao, H., P. Zheng, B. Yu, J. He, X. B. Mao, J. Yu, and D. W. Chen. 2014. Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. *Livest. Sci.* 167:249–256.
- Le Dividich, J., and B. Sève. 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domest. Anim.*

Endocrinol. 19:63–74.

Fascina, V., G. Pasquali, F. Carvalho, E. Muro, F. Vercese, M. Aoyagi, A. Pezzato, E. Gonzales, and J. Sartori. 2017. Effects of Phytogenic Additives and Organic Acids, alone or in combination, on the Performance, Intestinal Quality and Immune Responses of Broiler Chickens. *Rev. Bras. Ciência Avícola*. 19:497–508.

Fattori, V., F. A. Pinho-Ribeiro, S. M. Borghi, J. C. Alves-Filho, T. M. Cunha, F. Q. Cunha, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- $\kappa$ B activation. *Inflamm. Res.* 64:993–1003.

Francis, D. H. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J. Swine Heal. Prod.* 10:171–175.

G. Papatsiros, V. P., and C. Billinis. 2012. The Prophylactic Use of acidifiers as antibacterial agents in swine. In: *Antimicrobial Agents*. Vol. 3. InTech.

Gerez, J.R., Pinton, P., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P., Bracarense, A.P.F.L., 2015. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Exp. Toxicol. Pathol.* 67, 89–98.

Gong, J., H. Yu, T. Liu, M. Li, W. Si, C. F. M. de Lange, and C. Dewey. 2008. Characterization of ileal bacterial microbiota in newly-weaned pigs in response to feeding lincomycin, organic acids or herbal extract. *Livest. Sci.* 116:318–322.

Gong, Z., Q. Liu, L. Lin, Y. Deng, S. Cai, Z. Liu, S. Zhang, W. Xiao, S. Xiong, and D. Chen. 2018. L-Theanine prevents ETEC-induced liver damage by reducing intrinsic apoptotic response and inhibiting ERK1/2 and JNK1/2 signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.* 818:184–190.

Grenier, B., Loureiro-Bracarense, A.-P., Luciola, J., Pacheco, G.D., Cossalter, A.-M., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2011. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 761–771.

Grilli, E., B. Tugnoli, J. L. Passey, C. H. Stahl, A. Piva, and A. J. Moeser. 2015. Impact of dietary organic acids and botanicals on intestinal integrity and inflammation in weaned pigs. *BMC Vet. Res.* 11:96.

Guyonnet, J., B. Manco, L. Baduel, V. Kaltsatos, M. H. F. S. Aliabadi, and P. Lees. 2010. Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Res. Vet. Sci.* 88:307–314.

Heo, J. M., F. O. Opapeju, J. R. Pluske, J. C. Kim, D. J. Hampson, and C. M. Nyachoti. 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*. 97:207–237.

Hohmann, M. S. N., R. D. R. Cardoso, F. A. Pinho-Ribeiro, J. Crespigio, T. M. Cunha, J. C. Alves-Filho, R. V da Silva, P. Pinge-Filho, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2013. 5-Lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *Biomed Res. Int.* 2013:1–13.

Hu, C.-A. A., Y. Hou, D. Yi, Y. Qiu, G. Wu, X. Kong, and Y. Yin. 2015. Autophagy and

tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases. *Anim. Nutr.* 1:123–127. doi:10.1016/j.aninu.2015.08.014.

Jirillo, E., D. Caccavo, T. Magrone, E. Piccigallo, L. Amati, A. Lembo, C. Kalis, and M. Gumenscheimer. 2002. Review: The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J. Endotoxin Res.* 8:319–327.

Kempf, I., M. A. Fleury, D. Drider, M. Bruneau, P. Sanders, C. Chauvin, J.-Y. Madec, and E. Jouy. 2013. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 42:379–383.

König, J., J. Wells, P. D. Cani, C. L. García-Ródenas, T. MacDonald, A. Mercenier, J. Whyte, F. Troost, and R.-J. Brummer. 2016. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7:e196.

Kyriakis, S. C., V. K. Tsiloyiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A. C. Tsinas, C. Alexopoulos, and L. Jansegers. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 67:223–228.

Lallès, J.-P., P. Bosi, H. Smidt, and C. R. Stokes. 2007. Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livest. Sci.* 108:82–93.

Lessard, M., M. Dupuis, N. Gagnon, E. Nadeau, J. J. Matte, J. Goulet, and J. M. Fairbrother. 2009. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae* boulardii modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge<sup>1,2</sup>. *J. Anim. Sci.* 87:922–934.

Liu, Y., X. Yang, H. Xin, S. Chen, C. Yang, Y. Duan, and X. Yang. 2017. 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. *Anim. Sci. J.* 88:1414–1424.

Long, S.F., Xu, Y.T., Pan, L., Wang, Q.Q., Wang, C.L., Wu, J.Y., Wu, Y.Y., Han, Y.M., Yun, C.H., Piao, X.S., 2018. Mixed organic acids as antibiotic substitutes improve performance, serum immunity, intestinal morphology and microbiota for weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 235: 23–32.

Manzanilla, E. G., M. Nofrarías, M. Anguita, M. Castillo, J. F. Perez, S. M. Martín-Orúe, C. Kamel, and J. Gasa. 2006. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84:2743.

Masaki, T., S. Chiba, H. Tatsukawa, T. Yasuda, H. Noguchi, M. Seike, and H. Yoshimatsu. 2004. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- $\alpha$  in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* 40:177–184.

Mohamed, M. A., E. F. E.- Daly, N. A. A. E.- Azeem, A. W. Youssef, and H. M. A. Hassan. 2014. Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *Int. J. Poult. Sci.* 13:602–610.

Montagne, L., G. Boudry, C. Favier, I. Le Huërrou-Luron, J.-P. Lallès, and B. Sève. 2007. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *Br. J. Nutr.* 97:45.

Namkung, H., M. Li J. Gong, H. Yu, M. Cottrill, and C. F. M. de Lange. 2004. Impact of

feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 84:697–704.

Nandi, D., M. K. Mishra, A. Basu, and B. Bishayi. 2010. Effects of IL-18 and IL-10 pre-treatment on the alteration of endogenous cytokines in liver and spleen of mice with experimental endotoxemia. *Indian J. Exp. Biol.* 48:1103–10.

Oliveira, E. R., C. A. da Silva, R. J. H. Castro-Gómez, A. P. Lozano, D. F. Gavioli, J. Fietzen, E. O. da Silva, A. K. Novais, G. Frederico, and M. Pereira Júnior. 2017. Chito-oligosaccharide as growth promoter replacement for weaned piglets: performance, morphometry, and immune system. *Semin. Ciências Agrárias.* 38:3253.

Omonijo, F. A., L. Ni, J. Gong, Q. Wang, L. Lahaye, and C. Yang. 2017. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* 1–11.

Partanen, K., H. Siljander-Rasi, J. Pentikäinen, S. Pelkonen, and M. Fossi. 2007. Effects of weaning age and formic acid-based feed additives on pigs from weaning to slaughter. *Arch. Anim. Nutr.* 61:336–356.

Pinho-Ribeiro, F. A., M. S. N. Hohmann, S. M. Borghi, A. C. Zarpelon, C. F. S. Guazelli, M. F. Manchope, R. Casagrande, and W. A. Verri. 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B. *Chem. Biol. Interact.* 228:88–99.

Pluske, J. R., D. J. Hampson, and I. H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51:215–236.

Rahman, I., A. Kode, and S. K. Biswas. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1:3159–3165.

Reichling, J., P. Schnitzler, U. Suschke, and R. Saller. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an Overview. *Complement. Med. Res.* 16:79–90.

Rhouma, M., F. Beaudry, W. Thériault, N. Bergeron, S. Laurent-Lewandowski, J. M. Fairbrother, and A. Letellier. 2015. Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149: F4 (K88). *Res. Vet. Sci.* 102:173–181.

Rhouma, M., F. Beaudry, W. Thériault, and A. Letellier. 2016. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Front. Microbiol.* 7:1789.

Rhouma, M., J. M. Fairbrother, F. Beaudry, and A. Letellier. 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet. Scand.* 59:31.

Schauber, J., C. Svanholm, S. Termén, K. Iffland, T. Menzel, W. Scheppach, R. Melcher, B. Agerberth, H. Lührs, and G. H. Gudmundsson. 2003. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut.* 52:735–41.

Seal, B. S., H. S. Lillehoj, D. M. Donovan, and C. G. Gay. 2013. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim.*

Heal. Res. Rev. 14:78–87.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.

Su, G. L. 2002. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 283:G256–G265.

Suiryanrayna, M. V. A. N., and J. V Ramana. 2015. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:45.

Sultanbawa, Y. 2011. Plant antimicrobials in food applications: minireview, in *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* 1084–1099.

Sun, Y., and S. W. Kim. 2017. Intestinal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea. *Anim. Nutr.* 3:322–330.

Tan, C., H. Wei, H. Sun, J. Ao, G. Long, S. Jiang, and J. Peng. 2015. Effects of dietary supplementation of oregano essential oil to Sows on oxidative stress status, lactation feed intake of sows, and piglet performance. *Biomed Res. Int.* 2015:1–9.

Thacker, P. A. 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J Anim Sci Biotechnol.* 4:35.

Tsiloyiannis, V. K., S. C. Kyriakis, J. Vlemmas, and K. Sarris. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 70:287–293.

Wyns, H., E. Plessers, P. De Backer, E. Meyer, and S. Croubels. 2015. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 166:58–69.

Xia, P.-Y. 2002. Relationship between lymphocyte apoptosis and endotoxin translocation after thermal injury in rats. *World J. Gastroenterol.* 8:546.

Xu, Y. T., L. Liu, S. F. Long, L. Pan, and X. S. Piao. 2018. Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 235:110–119.

Yu, J., Y. Zhang, X. Song, Y. Yang, R. Jia, X. Chen, K. Sun, L. Li, X. Zhao, Q. Cui, Q. Fu, Y. Zou, L. Li, and Z. Yin. 2017. Effect of modified Pulsatilla powder on enterotoxigenic *Escherichia coli* O101-induced diarrhea in mice. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2017:1–11.

Zeng, Z., S. Zhang, H. Wang, and X. Piao. 2015. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:7.

Zhu, L., X. Cai, Q. Guo, X. Chen, S. Zhu, and J. Xu. 2013. Effect of N-acetyl cysteine on enterocyte apoptosis and intracellular signalling pathways' response to oxidative stress in weaned piglets. *Br. J. Nutr.* 110:1938–1947.

**Table 1.** Centesimal and nutritional composition of the experimental rations.

<b>Ingredients (%)</b>	<b>Pre-initial II</b>	<b>Initial I</b>
Corn	39,94	47,70
Soybean meal	20,06	27,30
Maxi core <sup>1</sup>	40,00	0,00
Maxi core <sup>2</sup>	0,00	25,00
Total	100,00	100,00

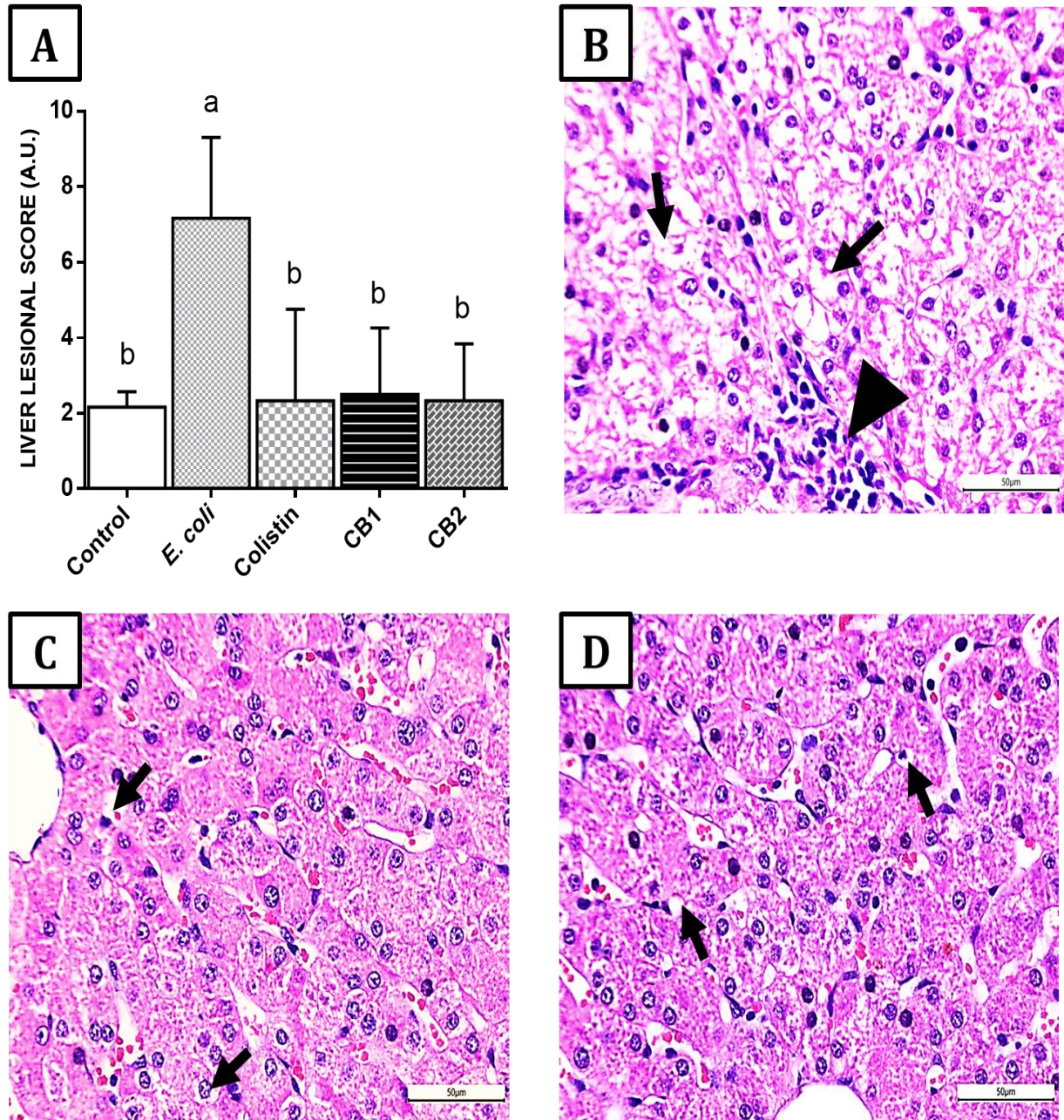
<b>Nutritional levels</b>		
Protein (%)	19,00	19,00
Fat (%)	4,59	3,52
Calcium (%)	0,91	1,00
Phosphorus available (%)	0,46	0,48
Metabolizable energy (Kcal/kg)	3403	3310
Digestible Lys (%)	1,45	1,35
Digestible Met+ Cys (%)	0,81	0,75
Digestible Thr (%)	0,97	0,90
Digestible Trp (%)	0,28	0,26
Total Lactose (%)	9,85	5,11
Mineral matter (%)	6,45	6,62

<sup>1</sup> Levels of guarantee per kg of product Maxi core used in the pre-initial ration II: Humidity (max) 100.00 g; Crude Protein (min) 154.00 g; Ethereal Extract (min) 73.00 g; Gross Fiber (max) 50.00 g; Mineral Matter (max.) 300.00 g; Calcium (min / max) 16.00 / 24.00 g; Sodium (min) 8,000.00 mg; Phosphorus (min) 10.00 g; Lysine (min) 24.00 g; Methionine (min) 7,800.00 mg; Threonine (min) 15.00 g; Tryptophan (min) 3,300.00 mg; Cobalt (min) 2.00 mg; Iron (min) 142.00 mg; Iodine (min) 2.00 mg; Manganese (min) 100.00 mg; Selenium (min) 1.00 mg; Folic Acid (min) 9.00 mg; Choline (min) 1.225,00 mg; Niacin (min) 95.00 mg; Calcium Pantothenate (min) 31.00 mg; Vitamin A (min) 32,000.00 IU; Vitamin B1 (min.) 6.00 mg; Vitamin B12 (min) 96.00 mcg; Vitamin B2 (min) 19.00 mg; Vitamin B6 (min) 9.00 mg; Vitamin D3 (min) 6,400.00 IU; Vitamin E (min) 160.00 IU; Vitamin H (min) 0.60 mg; Vitamin K (min) 6.00 mg. Main Ingredients: Biscuit Bran (27%), Whole Soybean Extract (9%), Plasma (5%), Bicalcic Phosphate (3%), Calcitic calcary (2%), Common Salt ), Whey (33%), Milk powder (4%).

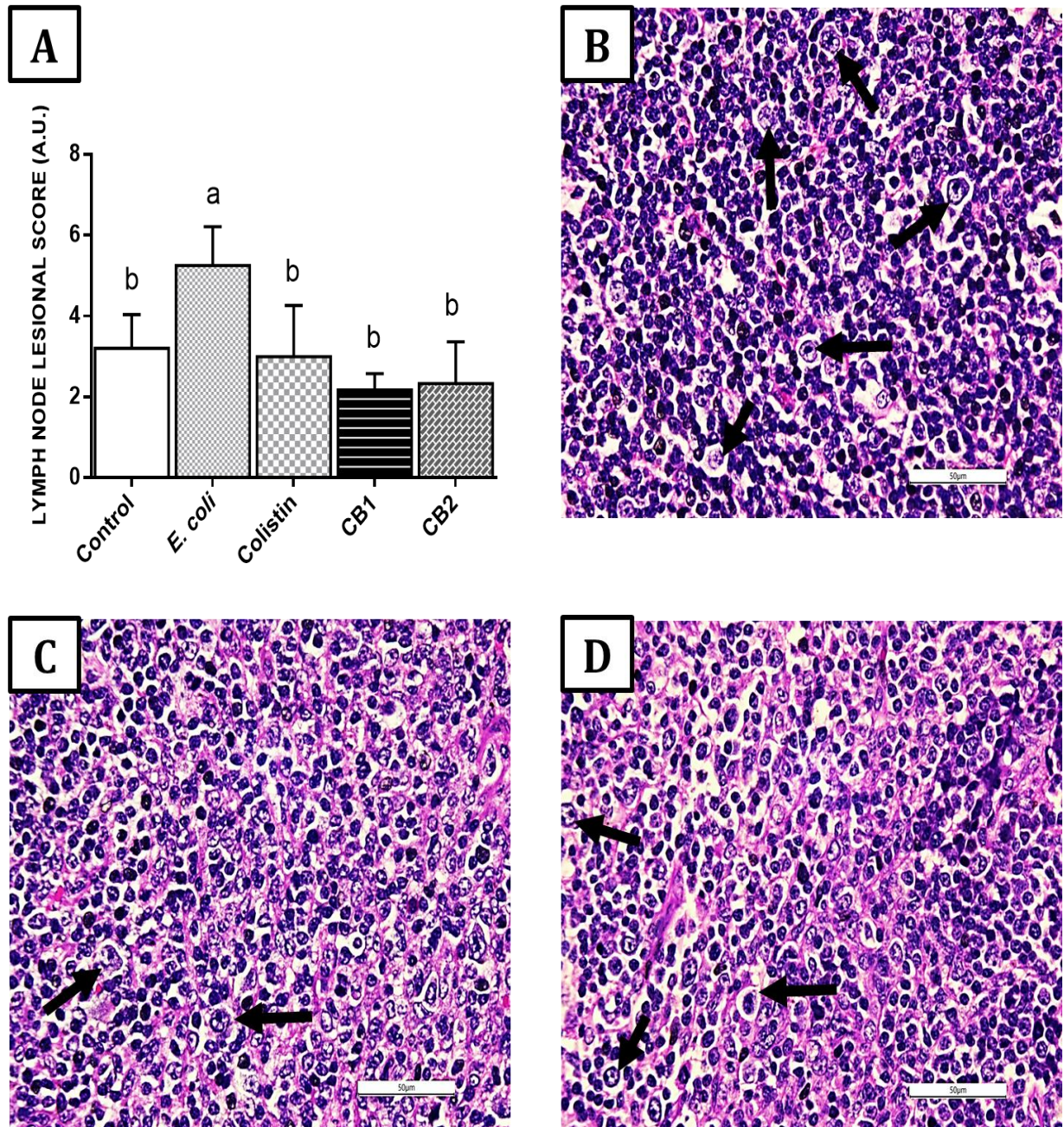
<sup>2</sup> Levels of guarantee per kg of product Maxi core used in the Initial ration I: Humidity (max) 100.00 g; Crude Protein (min) 84.00 g; Ethereal Extract (min) 63.00 g; Gross Fiber (max) 50.00 g; Mineral Matter (max.) 300.00 g; Calcium (min / max) 28.00 / 44.00 g; Phosphorus (min) 15.00 g; Sodium (min) 11.00 g; Lysine (min) 20.00 g; Methionine (min) 4,900.00 mg; Threonine (min) 10.00 g; Cobalt (min) 5.00 mg; Iron (min) 251.00 mg; Iodine (min) 5.00 mg; Manganese (min) 200.00 mg; Selenium (min) 2.00 mg; Folic Acid (min) 3.00 mg; Choline (min) 2,672.00 mg; Niacin (min) 129.00 mg; Calcium Pantothenate (min) 60.00 mg; Vitamin A (min) 38,000.00 IU; Vitamin B1 (min.) 8.00 mg; Vitamin B12 (min) 129.00 mcg; Vitamin B2 (min) 25.00 mg; Vitamin B6 (min) 12.00 mg; Vitamin D3 (min) 9,000.00 IU; Vitamin E (min) 807.00 IU; Vitamin H (min) 0.50 mg; Vitamin K (min) 9.00 mg. Main ingredients: Biscuit Bran (33%), Bicalcic Phosphate (7%), Calcitic calcary (4%), Common Salt (2%), Sugar (19%), Whey (29%).

**Table 2.** Establishment of a lesion score – endpoints used to assess histological lesions.

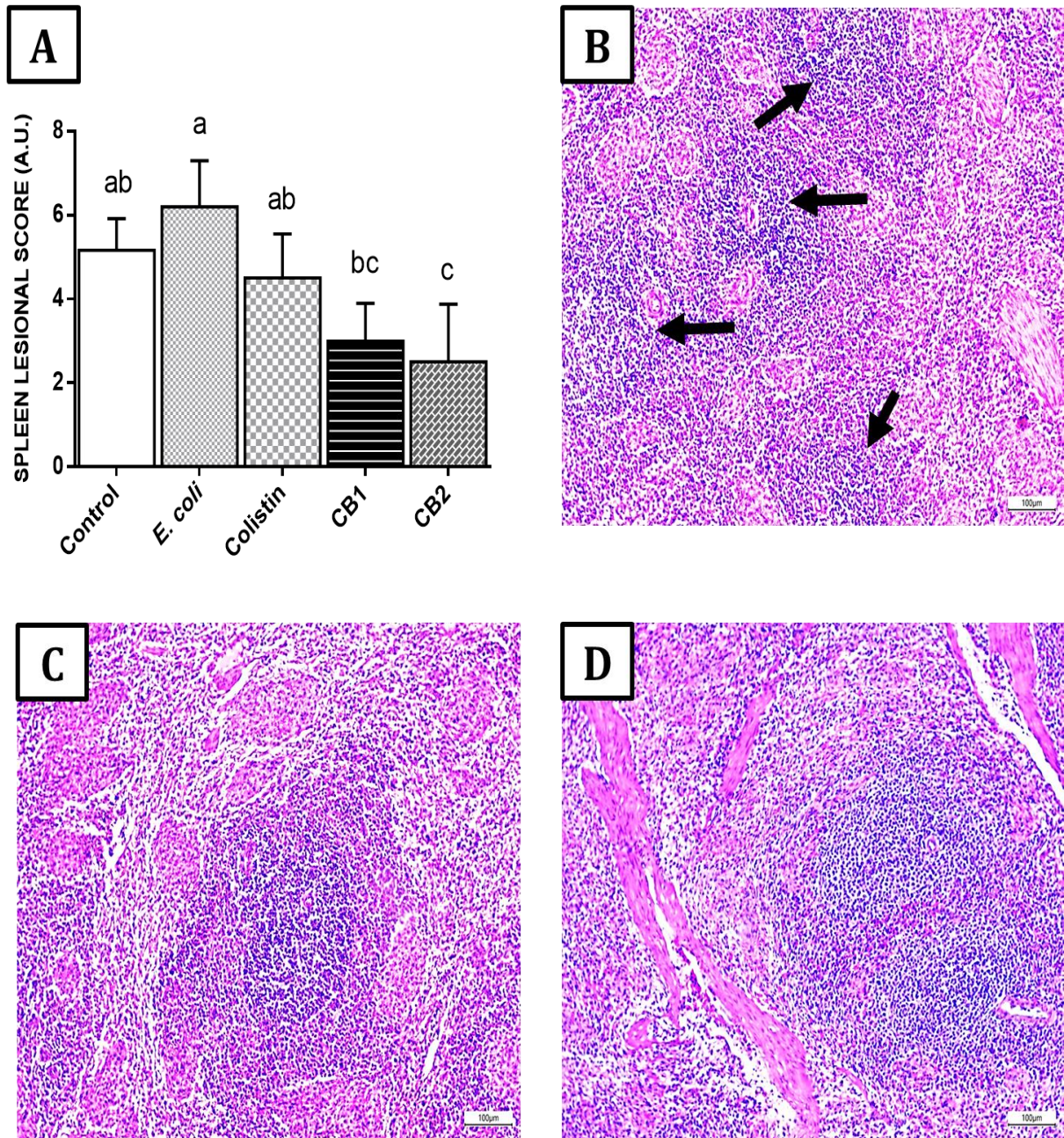
<b>Tissue</b>	<b>Type of lesions (severity factor)</b>	<b>Maximal score</b>
<b>Liver</b>	Disorganization of hepatic cords (1) Inflammation (1) Hepatic cell vacuolization (1) Apoptosis (2) Megalocytosis (2) Nuclear vacuolation (1) Necrosis (3)	33
<b>Lymph nodes</b>	Depletion (1) Germinal centre (1) Histiocytes (2) Inflammatory infiltrate (2) Apoptosis (1) Necrosis (3) Mitosis (1)	33
<b>Spleen</b>	Hyperplasia (2) Germinal centre (1) Histiocytes (2) Inflammatory infiltrate (2) Apoptosis (1) Necrosis (3) Mitosis (1)	36
<b>Kidney</b>	Glomerulonephritis (2) Inflammatory infiltrate (1) Congestion (1) Cytoplasmic vacuolization (1) Nuclear vacuolation (1) Tubular casts (1) Apoptosis (1) Necrosis (3)	33
<b>Lung</b>	Alveolar edema (2) Interstitial pneumonia (2) Hypertrophy muscle cell (1) Hemorrhage (1) Vascular congestion (1)	21



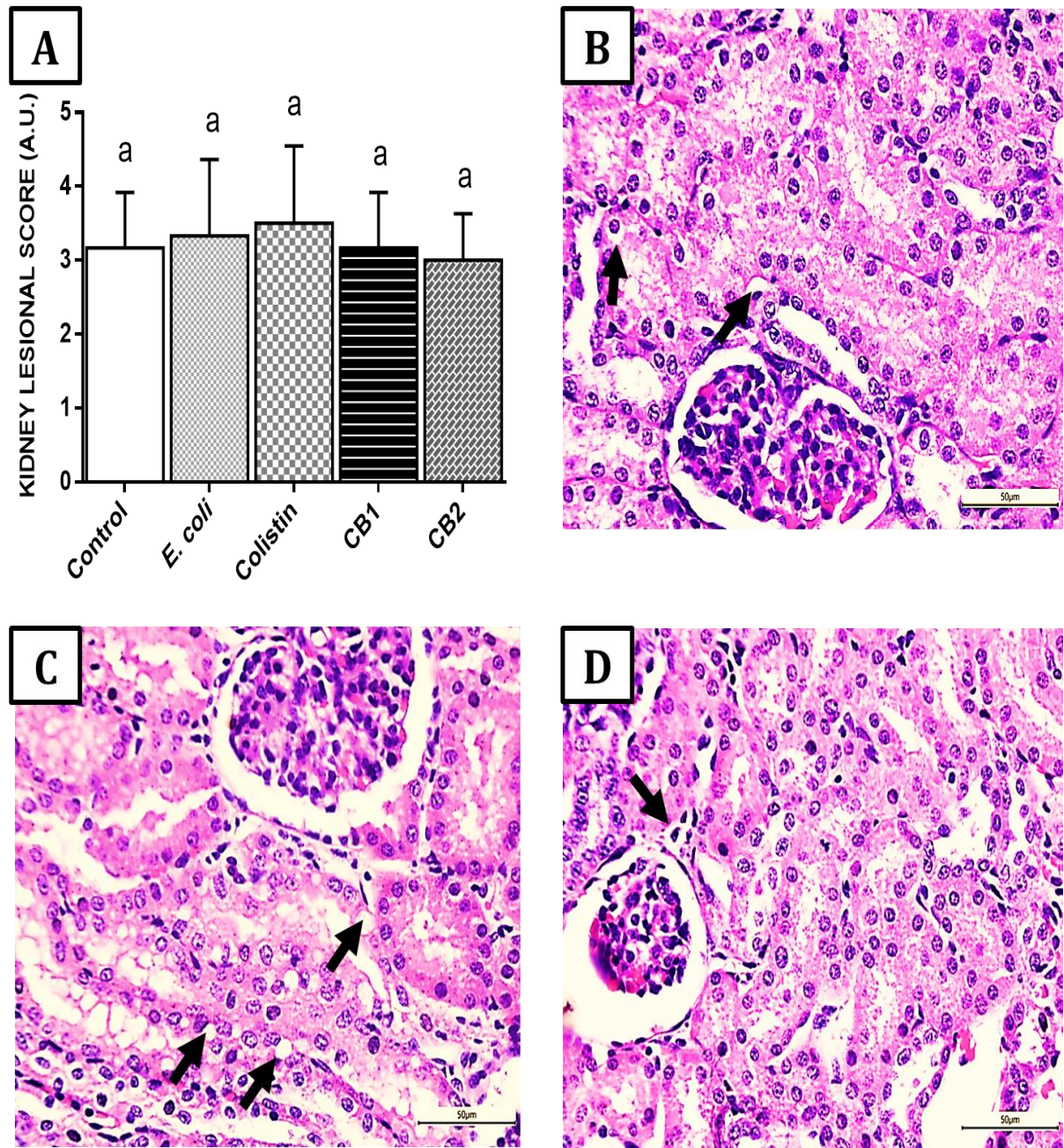
**Figure 1.** Effects of colistin and commercial blend on the liver. (A) Hepatic lesional score, values are mean±SD for six animals. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ). (B) Liver of a piglet of the *E. coli* group with hepatocyte cytoplasmic vacuolization (arrow) and lymphocytic infiltrate (arrow head), HE, 40x; (C) liver of a piglet of colistin group with mild hepatocyte cytoplasmic vacuolization (arrow), HE, 40x; (D) liver of a piglet of CB2 group with scarce hepatocyte cytoplasmic vacuolization (arrow), HE, 40x. CB1= basal diet supplemented with 1 kg commercial blend /ton. CB2= basal diet supplemented with 2 kg commercial blend /ton.



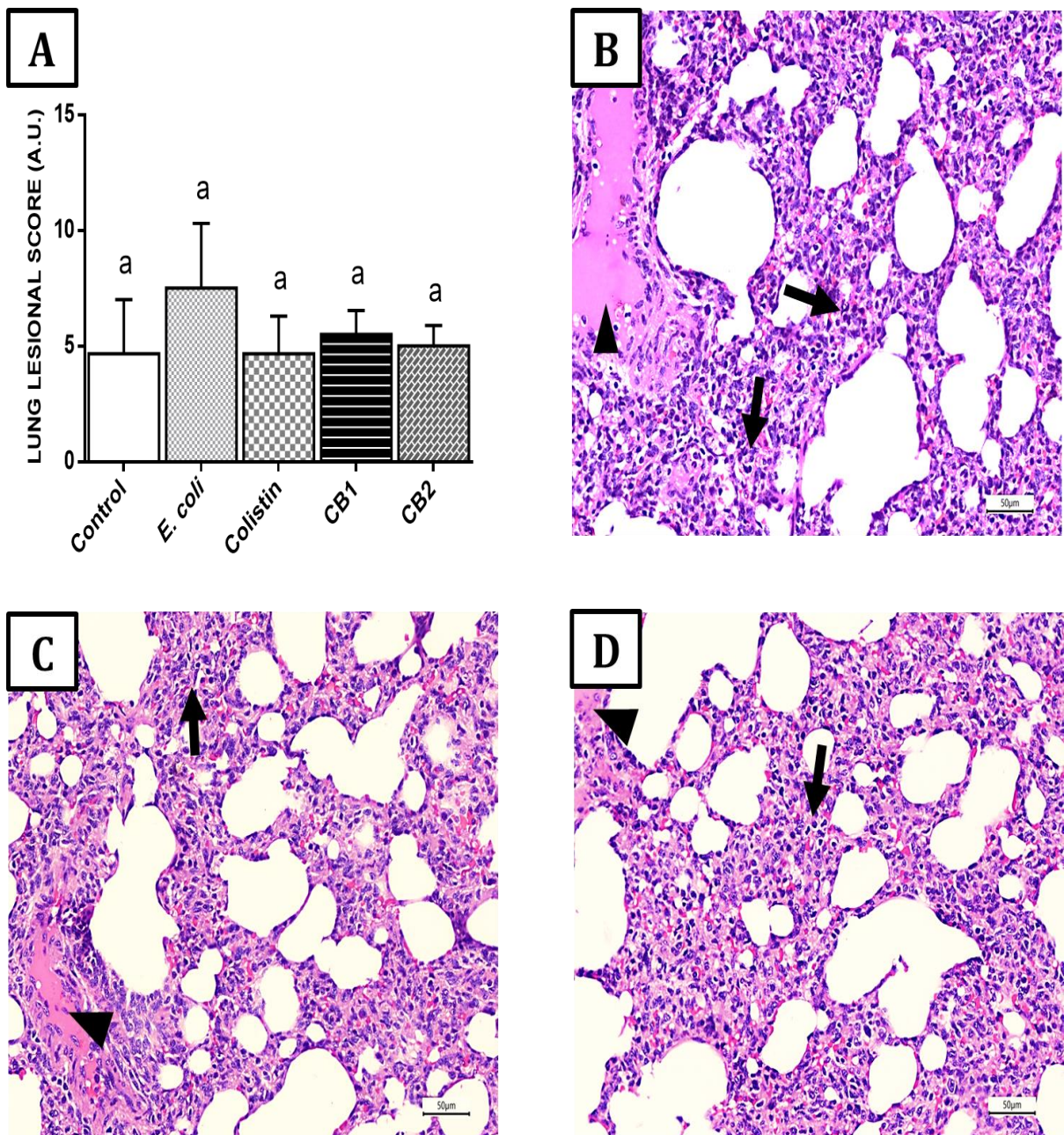
**Figure 2.** Effects of colistin and commercial blend on the mesenteric lymph node. (A) Lymph node lesional score, values are mean $\pm$ SD for six animals. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ). (B) Lymph node of a piglet of the *E. coli* group with a large number of activated macrophages in medullary sinuses (arrow), HE, 40 $\times$ ; (C) lymph node of a piglet of the colistin group with slight macrophage activation in medullary sinuses (arrow), HE, 40 $\times$ ; (D) lymph node of a piglet of the CB2 group with a lower macrophage activation in medullary sinuses (arrow), HE, 40 $\times$ . CB1= basal diet supplemented with 1 kg commercial blend /ton. CB2= basal diet supplemented with 2 kg commercial blend/ ton.



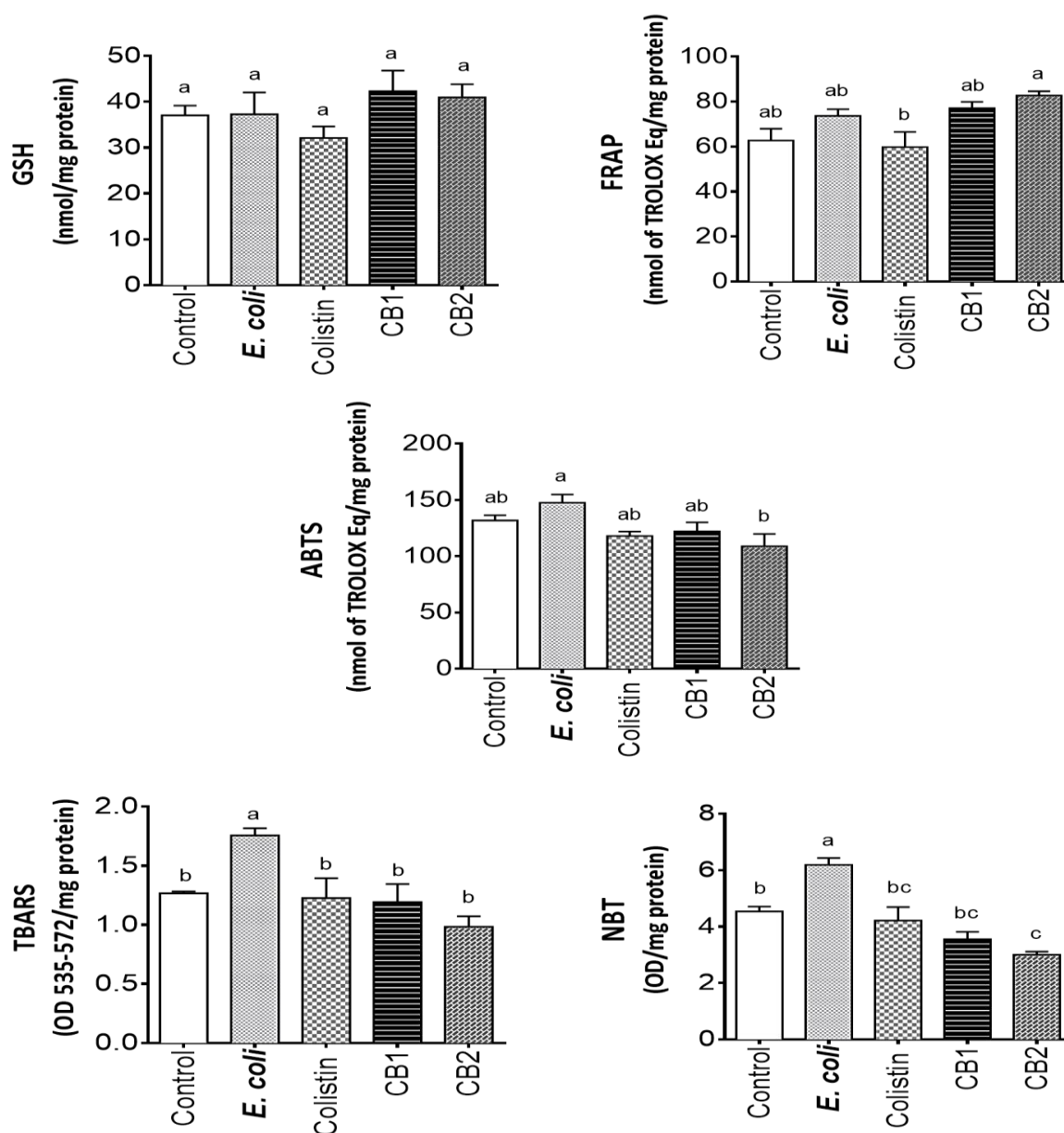
**Figure 3.** Effects of colistin and commercial blend on the spleen. (A) Spleen lesion score, values are mean $\pm$ SD for six animals. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ). (B) Spleen of a piglet of the *E. coli* group with hyperplasia of lymphoid follicles (arrow), HE, 10 $\times$ ; (C-D) spleen of a piglet treated with colistin and CB2 without hyperplasia of the lymphoid follicles, HE, 10 $\times$ . CB1= basal diet supplemented with 1 kg commercial blend /ton. CB2= basal diet supplemented with 2 kg commercial blend/ ton.



**Figure 4.** Effects of colistin and commercial blend on the kidney. (A) Kidney lesion score, values are mean $\pm$ SD for six animals. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ). (B) Kidney of a piglet of the *E. coli* group with slight cytoplasmic vacuolization of tubular cells (arrow), HE, 40 $\times$ ; (C) Kidney of a piglet of the colistin group with slight cytoplasmic vacuolization of tubular cells (arrow), HE, 40 $\times$ ; (D) Kidney of a piglet of the CB2 group with slight cytoplasmic vacuolization of tubular cells (arrow), HE, 40 $\times$ . CB1= basal diet supplemented with 1 kg commercial blend /ton. CB2= basal diet supplemented with 2 kg commercial blend/ ton.



**Figure 5.** Effects of colistin and commercial blend on the lung. (A) Lung lesional score, values are mean $\pm$ SD for six animals. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). (B) Lung of a piglet of the *E. coli* group with interstitial pneumonia (arrow) and intra-alveolar edema (arrow head), HE, 20 $\times$ ; (C) Lung of a piglet of the colistin group with interstitial pneumonia (arrow) and intra-alveolar edema (arrow head), HE, 20 $\times$ ; (D) Lung of a piglet of the CB2 group with interstitial pneumonia (arrow) and intra-alveolar edema (arrow head), HE, 20 $\times$ . CB1= basal diet supplemented with 1 kg commercial blend /ton. CB2= basal diet supplemented with 2 kg commercial blend/ ton.



**Figure 6.** Effects of colistin and commercial blend on hepatic oxidative stress. Values are mean $\pm$ SD for six animals. <sup>a,b</sup> Mean values with unlike letters were significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ). CB1= basal diet supplemented with 1 kg commercial blend/ton. CB2= basal diet supplemented with 2 kg commercial blend/ ton.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

O fornecimento a leitões desmamados de uma mistura comercial de ácidos orgânicos e óleo essencial de canela na dose de 2kg / ton tem efeitos favoráveis sobre integridade tecidual, protegendo principalmente a mucosa intestinal, o fígado e os órgãos linfóides (baço e linfonodo mesentérico) contra danos causados por o desafio bacteriano e o desmame, tendo efeitos benéficos similares ou incluso melhores do que o antibiótico colistina.

E, portanto, nosso estudo sugere que a mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial de canela pode ser usada como alternativa aos antibióticos para o desmame de suínos.

Assim também, a pesquisa provê uma base teórica para apoiar o uso de combinações desses aditivos na indústria suína, não apenas como melhoradores da saúde intestinal, mas também benéficos para a saúde geral.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 15/2019

Londrina, 14 de Fevereiro de 2019.

Prezado (a) professor (a)


Em resposta ao pedido de adendo **13812.2017.19** referente ao projeto **14358.2015.95 "Avaliação dos produtos biotonic top 3 e biotronic top liquid sobre o desempenho e saúde intestinal de leitões desafiados com *Escherichia coli* k88"** sob a responsabilidade de Ana Paula Frederico R. L. Bracarense e já previamente aprovado pelo **OF. CIR. CEUA 152/2017**, a CEUA-UEL certifica que o mesmo teve parecer **aprovado** em **12/02/2019**.

O adendo solicita a eutanásia de **30 animais** (Leitões) oriundos da fazenda escola da UEL, sendo que o pedido inicial era de 36 animais para avaliar características histológicas dos órgãos, fígado, baço, linfonodo mesentérico, pulmão, rim, jejuno e íleo.

Os procedimentos experimentais não serão modificados em relação ao protocolo inicialmente proposto.

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UЕL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.



Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira  
Vice -Coordenador da CEUA/UЕL

**Ilmo.(a) Sr.(a)**  
**Prof. (a) Dr. (a) Ana Paula F. R. L. Bracarense**  
Responsável pelo projeto  
Depto de DMVP/CCA  
Centro de Ciências Agrárias/CCA