

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATO PIROLENHOSO EM DIETAS PARA LEITÕES DESMAMADOS SOBRE A COMPOSIÇÃO MICROBIANA DO CONTEÚDO DO CECO

CÂNDIDA P. F. AZEVEDO¹, RENATA G. LEITE¹; LUÍSA C. F. POLIZEL²; ILORAN R. C. MOREIRA²; HÉLIO MOREIRA JÚNIOR¹; JOÃO V. P. FIORIO¹; THAÍS A. C. VAZ¹; JOSÉ M. M. ANDRADE¹; ANA L. H. BISTANE¹; CARMEN M. S. AMBROSIO¹; EDUARDO M. GLORIA¹; ALEXANDRE S. PIMENTA³; URBANO S. RUIZ¹

¹Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ²Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Botucatu ³Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Contato: candida.azevedo@usp.br / Apresentador: CÂNDIDA POLLYANNA FRANCISCO AZEVEDO

Resumo: Objetivou-se avaliar o extrato pirolenhoso (EP) em dietas para leitões recém desmamados sobre as concentrações de microrganismos no conteúdo do ceco dos animais. Utilizou-se 200 leitões desmamados aos 23 dias ($5,58 \pm 0,65$ kg), distribuídos em blocos casualizados, com 5 dietas, 10 repetições e 4 animais por baia. Os tratamentos foram: CN – controle negativo, dieta sem aditivo antimicrobiano; EP1: CN + 1 % de EP; EP2: CN + 2% de EP; EP3: CN + 3% de EP; e CP – CN + 120 ppm de Halquinol. No 14º dia do experimento um animal por baia foi sacrificado para coleta de amostras do conteúdo cecal, nas quais se fez extração, quantificação e sequenciamento do DNA bacteriano para identificação e quantificação dos gêneros presentes utilizando Dadda2 e os pacotes limma voom e edgeR. Os leitões que receberam a dieta EP3 apresentaram maior ($P < 0,05$) concentração de *Lactobacillus sp* no ceco em comparação aos animais CP e houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) na abundância relativa deste gênero pelo emprego do EP. Observou-se reduções numéricas de 92%, 76%, 29% e 26% nos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus*, *Campylobacter* e *Escherichia/Shigella*, respectivamente, entre os animais alimentados com CN e EP3. O EP apresenta potencial para ser utilizado como aditivo antimicrobiano em dietas para leitões.

PalavrasChaves: aditivo alternativo; Eucalyptus urograndis; saúde intestinal; microbiota; intestino

EFFECT OF PYROLIGNEOUS EXTRACT SUPPLEMENTATION IN WEANED PIGLETS DIETS ON CECUM CONTENT MICROBIAL COMPOSITION

Abstract: The aim of this study was to evaluate pyroligneous extract (PE) in diets for newly weaned piglets on the concentrations of microorganisms in the content of the animal's cecum. Two hundred piglets weaned at 23 days (5.58 ± 0.65 kg) were used, distributed in randomized blocks, with 5 diets, 10 replicates and 4 animals per pen. The treatments were: NC – negative control, diet without antimicrobial; EP1: NC + 1% EP; EP2: NC + 2% EP; EP3: NC + 3% EP; and PC (positive control) – CN + 120 ppm of Halquinol. On the 14th day of the experiment, one animal per pen was euthanized to collect samples of the cecal content, in which bacterial DNA extraction, quantification and sequencing were performed for identification and quantification of the genera present using Dadda2 and the limma voom and edgeR packages. Piglets fed the EP3 diet had greater ($P < 0.05$) concentration of *Lactobacillus sp* in the cecum compared to CP animals, and there was an increasing linear effect ($P < 0.05$) on the relative abundance of this genus by using PE. Numerical reductions of 92%, 76%, 29% and 26% were observed in the genera *Clostridium*, *Streptococcus*, *Campylobacter* and *Escherichia/Shigella*, respectively, among animals fed with CN and EP3. EP has the potential to be used as an antimicrobial in diets for piglets.

Keywords: alternative additives; intestinal health; Eucalyptus urograndis microbiota; gut.

Introdução: Aditivos antimicrobianos, como antibióticos e óxido de zinco, são adicionados às dietas de leitões pós-desmame para prevenir problemas entéricos e permitir que expressem todo seu potencial genético para crescimento. Porém, a possibilidade de resistência microbiana decorrente do uso de antibióticos e óxido de zinco provocou restrições a sua utilização na alimentação animal em diversos países, fomentando o desenvolvimento de aditivos alternativos, que atuam sobre a saúde e o desempenho animal, como o extrato pirolenhoso (EP) (Choi et al., 2009; Mathew et al., 2007). O EP é obtido pela condensação da fumaça da carbonização da madeira, é composto por 80 a 90% de água e diversos compostos orgânicos, como ácido acético, álcoois, acetonas, ésteres e furanos, com propriedades bactericidas e antifúngicas (Yang et al., 2016). O objetivo do presente estudo foi avaliar a suplementação de EP em dietas para leitões recém desmamados sobre a diversidade microbiana no conteúdo do ceco dos animais.

Material e Métodos: Foram utilizados 200 leitões mestiços (100 machos castrados e 100 fêmeas) desmamados aos 23 dias ($5,58 \pm 0,65$ kg), em um experimento em blocos casualizados, com 5 tratamentos, 10 repetições por tratamento, e 4 animais por baia. No 3º dia do experimento os animais receberam 1 mL de inóculo contendo *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), em $5,7$ a $6,4 \times 10^7$ UFC / mL. Os tratamentos foram: CN – controle negativo, dieta sem aditivo antimicrobiano; EP1: CN + 1 % de extrato pirolenhoso (EP) de *Eucalyptus urograndis*; EP2: CN + 2% de EP; EP3: CN + 3% de EP; e CP – (controle positivo): CN + 120 ppm de Halquinol. Ração e água foram fornecidas à vontade durante o período experimental. No 14º dia do experimento efetuou-se eutanásia de um animal por baia para coleta do conteúdo do ceco, em criotubos de 2,5 mL, que foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. Após a coleta realizou-se extração do DNA bacteriano, sua quantificação e sequenciamento para identificação e quantificação dos gêneros microbianos presentes pelo DADA2, que foram importados para o programa Phyloseq (McMURDIE; HOLMES, 2013), implementado no R. Para análise de abundância diferencial entre grupos, os pacotes limma voom foram utilizados para normalização, juntamente com o edgeR. Os resultados foram submetidos a análise de variância e, quando observado efeito de tratamentos, foram comparados pelo teste de Tukey e as dietas CN, EP1, EP2 e EP3 foram analisadas por regressão. Valores

de probabilidade foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultado e Discussão: A comunidade microbiana no trato gastrointestinal de leitões desempenha um papel essencial para a saúde, nutrição e desempenho animal. O estresse do desmame precoce envolve mudanças repentinas na dieta, aumentando a suscetibilidade dos leitões a doenças devido à instabilidade da microbiota intestinal. No presente estudo observou-se que os leitões que receberam a dieta EP3 apresentaram maior ($P < 0,05$) concentração de *Lactobacillus* sp no ceco em comparação aos animais do tratamento CP e que houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) na abundância relativa deste gênero de microrganismos pelo emprego do EP. Esses resultados são muito importantes pois *Lactobacillus* sp no ceco de suínos foram associados a melhora da eficiência alimentar e nas concentrações de acetato e butirato no conteúdo intestinal (Vigors et al., 2016). Além disso, os *Lactobacillus* sp estimulam a secreção de mucina, promovem a lise de proteínas com potencial alergênico no trato gastrintestinal, competem por nutrientes com outros microrganismos, fatores primordiais no controle de patógenos (Valeriano et. al, 2016). Por fim, observou-se reduções numéricas de 92%, 76%, 29% e 26% nas concentrações dos gêneros *Clostridium* 1, *Streptococcus*, *Campylobacter* e *Escherichia/Shiggella*, respectivamente, no conteúdo do ceco dos leitões EP3 comparativamente aos CN. Tais microrganismos podem afetar negativamente a saúde e podem ser letais a suínos (Higgins & Gottschalk, 1990; Li et al., 2018), de modo que seu controle é fundamental para boa saúde intestinal de leitões.

Conclusão: A suplementação com 3% de EP na dieta de leitões recém-desmamados proporcionou melhorias significativas na concentração de *Lactobacillus* sp em comparação ao tratamento CN e, além disso, reduziu numericamente a concentração de bactérias patogênicas no ceco dos leitões, indicando que o EP tem grande potencial para ser utilizado como aditivo antimicrobiano na suinocultura.

Agradecimentos: Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento deste estudo (Projeto2019/16519-1) e a empresa Ibiré pelo fornecimento do extrato pirolenhoso.

Referências Bibliográficas: CHOI J.Y.; SHINDE P.L.; KWON I.K.; et al. Effect of Wood Vinegar on the Performance, Nutrient Digestibility and Intestinal Microflora in Weanling Pigs. Asian Australian Journal Animal Science, v. 22, n. 2, p. 267-274, 2009. HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. REVIEW ARTICLE An update on *Streptococcus suis* identification. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 2, n. 3, p. 249-252, 1990. LI, Y.; GUO, Y.; WEN, Z.; et al. Weaning stress perturbs gut microbiome and its metabolic profile in piglets. Scientific Reports, v. 8, n. 18068, 2018. MATHEW, A.G.; CISSELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. Foodborne pathogens and disease, v.42, p.115-133, 2007. McMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS ONE, v. 8, e61217, 2013. VALERIANO, V. D. V; BALOLONG, M.P.; KANG. D. K. Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. Journal of Applied Microbiology, v. 122, n. 3, p. 554-567, 2016. VIGORS, S.; O'DOHERTY, J.V.; KELLY, A.K.; et al. The effect of divergence in feed efficiency on the intestinal microbiota and the intestinal immune response in both unchallenged and lipopolysaccharide challenged ileal and colonic explants. PLoS ONE, v. 11, n. 2, e0148145, 2016. YANG, J.; YANG, C.; LIANG, M.; et al. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi sinensis*. Molecules, v.21, 1– 10, 2016.