

CAROLINE BRITO DA SILVA

**PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA AO ÓXIDO DE ZINCO EM DIETAS DE
LEITÕES DOS 21 AOS 35 DIAS DE IDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alysso Saraiva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586p
2024
Silva, Caroline Brito da, 1996-
Probióticos como alternativa ao óxido de zinco em dietas de
leitões dos 21 aos 35 dias de idade / Caroline Brito da Silva. –
Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (31 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: Alysson Saraiva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 18-24.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.595>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Suínos - Nutrição. 2. Desmame. 3. Suínos - Doenças.
4. Probióticos. 5. Óxido de zinco - Aspectos ambientais.
I. Saraiva, Alysson, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.4084


CAROLINE BRITO DA SILVA

**PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA AO ÓXIDO DE ZINCO EM DIETAS DE
LEITÕES DOS 21 AOS 35 DIAS DE IDADE**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21/02/2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINE BRITO DA SILVA**
Data: 17/09/2024 13:08:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Caroline Brito da Silva
Autora

Documento assinado digitalmente
 **ALYSSON SARAIVA**
Data: 17/09/2024 09:49:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alysson Saraiva
Orientador

*À minha mãe, Carmen, e ao meu pai, Lessa, com
eterna gratidão e profundo amor.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Deus pela vida, por ser meu refúgio e fortaleza.

Aos meus pais, Carmen Lucia e Lessa, por acreditarem em mim todos os dias da minha vida, pelo apoio imensurável, por serem meus alicerces, minha fonte eterna de amor e cuidado.

Agradeço imensamente a minha irmã, Aline, minha fonte de inspiração para trabalho e perseverança.

Ao meu sobrinho Heitor, o meu maior presente dessa vida.

Ao meu cunhado, Roberto por todo apoio.

Ao meu noivo Rodrigo, àquele que ilumina meus dias com amor, carinho e muito apoio, agradeço por ser minha inspiração e por tornar cada desafio mais fácil de superar.

Ao meu grande amigo, Lucas Medina, que esteve comigo em todos os momentos dessa longa jornada, me incentivando, auxiliando nas atividades, nos estudos e tornando tudo mais simples.

Ao meu orientador, professor Alysson, pela confiança, por todas as oportunidades, contribuições e conselhos.

Especialmente, gostaria de agradecer ao meu “colega” Gustavo, por toda ajuda e disponibilidade na execução deste trabalho e em toda a jornada da pós-graduação. Sempre muito solícito, fez com que o processo fosse mais divertido e acolhedor.

Aos meus amigos da UEPE- Suinocultura: Dante, Marcos, Maykelly, Amanda, Elisa, Bianca Queiroz, que contribuíram (e muito) para a minha trajetória.

Aos meus grandes amigos da Zootecnia: Fábio e Júnia, pelo carinho, pelos conselhos e por todos os momentos que vivemos juntos.

Aos funcionários do setor de Suinocultura, Dedeco, Leandro, Arlindo e Sr. Valdeir, pelo companheirismo e cuidado que sempre tiveram comigo. A jornada foi muito mais agradável com o carinho e apoio de vocês.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por toda estrutura e excelência no ensino.

RESUMO

SILVA, Caroline Brito da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Probióticos como alternativa ao óxido de zinco em dietas de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.** Orientador: Alysso Saraiva.

O desmame é um dos períodos mais críticos na produção de suínos, caracterizado por mudanças ambientais, nutricionais e sociais que podem resultar em disbiose intestinal e aumento da incidência de diarreia. Uma abordagem para mitigar esses problemas tem sido o uso de doses farmacológicas de óxido de zinco (ZnO), que ajudam a controlar a diarreia pós-desmame. No entanto, o uso de ZnO em níveis elevados tem sido associado a preocupações ambientais e ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Em 2022, a União Europeia banuiu o uso de ZnO em doses farmacológicas, o que intensificou a busca por alternativas eficazes. Diante da proibição do ZnO, os probióticos emergem como uma alternativa promissora no controle da diarreia em leitões desmamados. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos dos probióticos *Bacillus subtilis* (GutPlus®) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Ecobiol®) no desempenho, morfologia intestinal e expressão de genes associados à integridade da barreira intestinal e ativação do sistema imunológico em leitões desmamados aos 21 dias de idade. Foram utilizados 150 leitões, desmamados aos 21 dias de idade, com peso inicial de $6,78 \pm 0,88$ kg, distribuídos em delineamento experimental em blocos (peso inicial) casualizados, em 5 dietas, 10 repetições e 3 animais por unidade experimental. As dietas foram constituídas por uma ração a base de milho e farelo de soja, sem adição de aditivos (controle negativo, CN); CN + 2500 mg/kg de ZnO (controle positivo, CP); CN + 500 g/Ton de GutPlus® (SUB); CN + 1000 g/Ton de Ecobiol® (AMY); CN + 250 g/Ton de GutPlus® + 500 g/Ton de Ecobiol® (SUB+AMY). Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) entre as dietas para consumo de ração diário, ganho de peso diário e conversão alimentar. Entretanto, os leitões que receberam a dieta CP apresentaram maior peso final ($P < 0,05$). As dietas CN e CP resultaram nos maiores ($P < 0,05$) valores de escore fecal, enquanto os grupos SUB, AMY e SUB+AMY apresentaram valores intermediários, sem diferença entre eles. Em relação à incidência de diarreia, CN teve o maior percentual, enquanto CP apresentou a menor incidência. As dietas SUB, AMY e SUB+AMY resultaram em valores intermediários para a incidência de diarreia. No duodeno, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as dietas em relação à altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas

(PC) ou relação vilo: cripta (AV:PC). No entanto, no jejuno, os leitões alimentados com as dietas CP e AMY apresentaram valores maiores de AV:PC ($P < 0,05$) em comparação aos leitões do grupo CN. No íleo, a altura das vilosidades e a profundidade das criptas não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$), porém, a relação AV:PC foi maior ($P < 0,05$) nos leitões alimentados com as dietas CP e SUB+AMY em comparação aos que receberam a dieta CN. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as dietas para a expressão dos genes HAP, IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF e OCL no jejuno dos leitões. No entanto, foi verificado aumento ($P < 0,05$) na expressão do gene IL-10 nas dietas CP e AMY em comparação com o grupo CN. Não houve diferença ($P > 0,05$) na expressão dos genes ocludina e zonula occludens, relacionados à integridade da barreira intestinal. A suplementação com *Bacillus amyloliquefaciens*, isoladamente ou em combinação com *Bacillus subtilis*, melhora a relação vilo: cripta no jejuno e íleo e reduz a incidência de diarreia em leitões desmamados. Além disso, esses probióticos aumentam a expressão do gene anti-inflamatório IL-10, evidenciando seu potencial para melhorar a saúde intestinal.

Palavras-chave: Suplementação. Desmame. Nutrição. Saúde intestinal.

ABSTRACT

SILVA, Caroline Brito da, M.Sc., Federal University of Viçosa, February, 2024. **Probiotics as alternative to zinc oxide in diets of piglets from 21 to 35 days of age.** Advisor: Alysso Saraiva.

Weaning is one of the most critical periods in pig production, characterized by environmental, nutritional, and social changes that can result in intestinal dysbiosis and increased incidence of diarrhea. One approach to mitigate these problems has been the use of pharmacological doses of zinc oxide (ZnO), which help control post-weaning diarrhea. However, the use of ZnO at high levels has been associated with environmental concerns and the development of antimicrobial resistance. In 2022, the European Union banned the use of ZnO at pharmacological doses, which intensified the search for effective alternatives. In view of the ZnO ban, probiotics emerge as a promising alternative in the control of diarrhea in weaned piglets. This study was carried out to evaluate the effects of the probiotics *Bacillus subtilis* (GutPlus®) and *Bacillus amyloliquefaciens* (Ecobiol®) on performance, intestinal morphology and expression of genes associated with intestinal barrier integrity and immune system activation in piglets weaned at 21 days of age. A total of 150 piglets, weaned at 21 days of age, with an initial weight of 6.78 ± 0.88 kg, were distributed in a randomized block experimental design (initial weight), in 5 diets, 10 replicates and 3 animals per experimental unit. The diets consisted of a ration based on corn and soybean meal, without added additives (negative control, CN); CN + 2500 mg/kg of ZnO (positive control, CP); CN + 500 g/ton of GutPlus® (SUB); CN + 1000 g/Ton of Ecobiol® (AMY); CN + 250 g/Ton of GutPlus® + 500 g/Ton of Ecobiol® (SUB+AMY). No effects ($P > 0.05$) were observed between the diets for daily feed intake, daily weight gain and feed conversion. However, the piglets that received the CP diet had a higher final weight ($P < 0.05$). The CN and CP diets resulted in the highest ($P < 0.05$) fecal score values, while the SUB, AMY and SUB+AMY groups showed intermediate values, with no difference between them. Regarding the incidence of diarrhea, CN had the highest percentage, while CP showed the lowest incidence. The SUB, AMY and SUB+AMY diets resulted in intermediate values for the incidence of diarrhea. In the duodenum, no differences ($P > 0.05$) were observed between diets regarding villus height (VH), crypt depth (CD) or villus:crypt ratio (VH:CD). However, in the jejunum, piglets fed the CP and AMY diets had higher VH:CD values ($P < 0.05$) compared to piglets in the CN

group. In the ileum, villus height and crypt depth did not differ between groups ($P > 0.05$), however, the VH:CD ratio was higher ($P < 0.05$) in piglets fed the CP and SUB+AMY diets compared to those fed the CN diet. No differences ($P > 0.05$) were observed between diets for the expression of the HAP, IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF and OCL genes in the jejunum of piglets. However, an increase ($P < 0.05$) in the expression of the IL-10 gene was observed in the CP and AMY diets compared to the CN group. There was no difference ($P > 0.05$) in the expression of the occludin and zonula occludens genes, related to the integrity of the intestinal barrier. Supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*, alone or in combination with *Bacillus subtilis*, improves the villus:crypt ratio in the jejunum and ileum and reduces the incidence of diarrhea in weaned piglets. Furthermore, these probiotics increase the expression of the anti-inflammatory gene IL-10, evidencing their potential to improve intestinal health.

Keywords: Supplementation. Weaning. Nutrition. Intestinal health.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.....	25
Tabela 2 - Composição nutricional calculada das dietas experimentais.....	26
Tabela 3 - Desenho dos <i>primers</i>	27
Tabela 4 - Efeito da suplementação com probióticos no desempenho de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.....	28
Tabela 5 - Efeito da suplementação com probióticos no escore fecal e na incidência de diarreia de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.....	28
Tabela 6 - Morfometria intestinal de leitões dos 21 aos 35 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com probióticos.....	29
Tabela 7 - Expressão gênica de citocinas e proteínas de junção no jejuno de leitões de 35 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com probióticos.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1	Animais, delineamento experimental e dietas experimentais.....	12
2.2	Escore fecal e incidência de diarreia.....	13
2.3	Procedimentos de abate e coleta de amostras do intestino.....	13
2.4	Análises de morfologia intestinal.....	14
2.5	Análises de expressão gênica.....	14
2.6	Análise estatística.....	14
3	RESULTADOS.....	15
3.1	Desempenho.....	15
3.2	Escore fecal e incidência de diarreia.....	Erro! Indicador não definido.
3.3	Morfometria intestinal.....	15
3.4	Expressão gênica.....	15
4	DISCUSSÃO.....	16
5	CONCLUSÃO.....	18
6	REFERÊNCIAS.....	18
	ANEXO.....	31

1 INTRODUÇÃO

O desmame é um dos períodos mais críticos na produção de suínos, caracterizado por mudanças ambientais, nutricionais e sociais que podem resultar em disbiose intestinal e aumento da incidência de diarreia. Uma abordagem para mitigar esses problemas tem sido o uso de doses farmacológicas de óxido de zinco (ZnO), que ajudam a controlar a diarreia pós-desmame. No entanto, o uso de ZnO em níveis elevados tem sido associado a preocupações ambientais e ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Slifierz et al., 2015; Jensen et al., 2016). Em 2022, a União Europeia banuiu o uso de ZnO em doses farmacológicas (Guan et al., 2023), o que intensificou a busca por alternativas eficazes.

Diante da proibição do ZnO, os probióticos emergem como uma alternativa promissora no controle da diarreia em leitões desmamados. Estudos apontam que cepas de *Bacillus subtilis* têm mostrado resultados positivos na modulação da microbiota intestinal, reduzindo a colonização de patógenos proporcionando uma barreira intestinal mais eficiente (Valente et al., 2023). Essas cepas também são conhecidas por estimular a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC's), que fornecem energia para as células intestinais e contribuem para a integridade da mucosa intestinal (Pieper et al., 2016). A suplementação com *Bacillus subtilis*, por exemplo, tem sido associada à redução significativa na incidência de diarreia e à melhoria na morfologia intestinal, com o aumento na altura das vilosidades e da relação vilo:cripta, essenciais para a absorção eficiente de nutrientes (Valente et al., 2023).

O desmame também resulta em mudança abrupta da dieta, impactando negativamente a morfologia intestinal e a função de barreira do intestino. Isso resulta em disbiose e aumento da suscetibilidade a infecções intestinais (Pluske et al., 2018). Nesse contexto, os probióticos oferecem uma solução viável, especialmente cepas como *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, que têm a capacidade de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal. Essas cepas promovem o equilíbrio da microbiota intestinal, reduzem a diarreia e, conseqüentemente, melhoram os resultados de desempenho (Guan et al., 2023).

A disbiose intestinal, uma condição comum durante o desmame, é marcada pela alteração na composição da microbiota, com redução nas populações de bactérias benéficas como *Lactobacillus* e aumento de patógenos como *Escherichia coli* e essas alterações podem levar a inflamação e diarreia em leitões (Park et al., 2024). A suplementação com probióticos tem se mostrado eficaz em reequilibrar a microbiota intestinal, promovendo a colonização de bactérias benéficas e inibindo patógenos. Além disso, os probióticos podem estimular a produção de AGCCs, que melhoram a saúde intestinal ao fornecer energia para as células

intestinais e fortalecer a barreira intestinal, prevenindo a translocação de microrganismos patogênicos (Valente et al., 2023).

Dessa forma, a hipótese é de que a inclusão de probiótico na dieta melhora, de forma semelhante ao óxido de zinco, o desempenho, a morfologia e a integridade epitelial do intestino e diminui a ativação do sistema imunológico de leitões desmamados aos 21 dias de idade.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos dos probióticos *Bacillus subtilis* (GutPlus®) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Ecobio1®) no desempenho, na morfologia intestinal e na expressão de genes associados à integridade da barreira intestinal e ativação do sistema imunológico em leitões desmamados aos 21 dias de idade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os métodos envolvendo a manipulação dos suínos seguiram os princípios éticos da pesquisa com animais (CONCEA, 2016) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 74/2022).

2.1 Animais, delineamento experimental e dietas experimentais

Foram utilizados 150 leitões, híbridos comerciais (Agroceres PIC), machos castrados e fêmeas, desmamados aos 21 dias de idade, com peso inicial de $6,78 \pm 0,88$ kg, distribuídos em delineamento experimental em blocos (peso inicial) casualizados, em 5 dietas, 10 repetições e 3 animais por unidade experimental, representada pela gaiola.

Os animais foram alojados durante o período experimental de 14 dias (21 aos 35 dias de idade) em gaiolas metálicas sujas, com pisos plásticos e laterais teladas, dotadas de comedouros semiautomáticos e bebedouros tipo chupeta, localizadas em salas de creche climatizadas.

A temperatura no interior das salas foi registrada diariamente (17:00 h), através de termômetros de máxima e mínima, mantidos em uma gaiola vazia no centro da sala, a meia altura do corpo dos animais. Durante o período experimental as temperaturas mínima e máxima registradas no interior das instalações foram de $27,72 \pm 1,2^\circ\text{C}$ e $29,7 \pm 1,1^\circ\text{C}$, respectivamente.

As dietas experimentais (Tabela 1 e 2) foram formuladas para atender às exigências nutricionais de suínos na fase pré-inicial (Rostagno et al., 2011) e foram constituídas por uma

dieta a base de milho e farelo de soja, sem inclusão de aditivos (controle negativo, CN); CN + 2500 mg/kg de ZnO (controle positivo, CP); CN + 500 g/t de GutPlus® (SUB); CN + 1000 g/Ton de Ecobiol® (AMY); CN + 250 g/t de GutPlus® + 500 g/t de Ecobiol® (SUB+AMY).

As rações e a água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental (21 a 35 dias de idade). As rações, as sobras e os desperdícios de ração foram pesados periodicamente e os animais foram pesados aos 21 e aos 35 dias de idade (final do período experimental) para determinação do peso inicial, do peso final, do consumo de ração diário (CRD), do ganho de peso médio diário (GPD) e da conversão alimentar (CA).

2.2 Escore fecal e incidência de diarreia

O escore fecal de cada animal foi avaliado visualmente das 8h às 11h por apenas um observador, dos 21 a 35 dias de idade, utilizando o método descrito por Liu et al. (2010). As fezes frescas foram classificadas usando a seguinte escala: 1 = sólido; 2 = semi-sólido; 3 = semilíquido; e 4 = líquido. A ocorrência de diarreia foi definida como a produção de fezes no nível 3 ou 4 por dois dias contínuos. Incidência de diarreia (%) = [número de animais com diarreia em cada gaiola × dias de diarreia / (3 animais × 14 dias)] × 100.

2.3 Procedimentos de abate e coleta de amostras do intestino

Aos 35 dias de idade, um animal de cada unidade experimental (gaiola), com peso corporal médio mais próximo do peso médio dos leitões de sua respectiva unidade, foi insensibilizado e abatido por sangramento para coleta de amostras para análises histológicas e moleculares.

As amostras destinadas às análises histológicas (cortes de 2 x 3 cm) foram acondicionadas em frascos de 50 mL, com paraformaldeído a 4% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e incubadas *overnight* a temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram conservadas em etanol 70% até o processamento para a confecção dos blocos e cortes histológicos.

Para análise molecular, as amostras foram coletadas e inseridas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram transferidas para armazenamento em freezer -80°C até o processo de extração do RNA.

Foram coletados segmentos de 2,0 x 2,0 cm nas regiões correspondentes ao duodeno (um segmento a 10 cm a partir do piloro), jejuno (três segmentos na porção média do intestino) e íleo (um segmento a 5 cm anterior a junção íleo-cecal), de acordo com Yang et al.

(2014). Em seguida, os cortes histológicos foram lavados em solução fisiológica e fixados em solução de paraformaldeído 4,0%, por 24 horas à temperatura ambiente.

2.4 Análises de morfologia intestinal

Os cortes histológicos (duodeno, jejuno e íleo) foram cortados transversalmente e secos em gradiente etílico crescentes, diafanizados em HistoChoice e incluídos em Paraplast líquido a 65 °C. Cinco cortes transversais com 5 µm de espessura cada foram colocados por lâmina e foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Os cortes foram semi-seriados, utilizando 1 a cada 10 cortes. A leitura das lâminas foi realizada utilizando o microscópio óptico EVOS M5000 Imaging System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) com ampliação de 10x. Em seguida, as imagens foram analisadas pelo analisador de imagens ImageJ 1.50i; java1.6.0_20 (National Institutes of Health, USA). Foram selecionadas e medidas as alturas de 20 vilosidades e suas respectivas 20 criptas, bem orientadas e seccionadas longitudinalmente de acordo com Satessa et. al. (2020). A relação vilo:cripta também foi analisada. Todas as medidas foram feitas por um único indivíduo.

2.5 Análises de expressão gênica

A extração total de RNA foi realizada com Trizol (Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA será estimada pelo espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha), e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0%. A síntese complementar de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Goscript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os números do GenBank para acessar os primers dos genes são mostrados na Tabela 3. Os primers foram utilizados para transcrição reversa quantitativa de PCR com GoTaq qPCR Master Mix (Promega) em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Como controle endógeno, o gene Beta- actina (ACTB) foi escolhido com base em sua expressão e estabilidade entre os tratamentos. A expressão relativa do gene de interesse foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001).

2.6 Análise estatística

A gaiola foi considerada a unidade experimental para a análise de desempenho (CRD, GPD, CA e peso final). Apenas um leitão de cada unidade experimental foi considerado a

unidade experimental para análise da morfologia intestinal e expressão gênica. Os dados foram analisados utilizando o software de domínio público R versão 3.4.3 (2017). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK). O valor de $P < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística e valores de P entre 0,05 e 0,10 foram considerados como tendência.

3 RESULTADOS

3.1 Desempenho, escore fecal e incidência de diarreia

Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) entre as dietas para CRD, GPD e CA (Tabela 4). Entretanto, os leitões que receberam a dieta CP apresentaram maior peso final ($P < 0,05$).

As dietas CN e CP resultaram nos maiores ($P < 0,05$) valores de escore fecal. Os leitões alimentados com as dietas SUB, AMY e SUB+AMY apresentaram valores intermediários de escore fecal (Tabela 5). Em relação à incidência de diarreia, o grupo CN apresentou o maior percentual (18,09%), e o grupo CP apresentou a menor incidência (7,14%). As dietas SUB, AMY e SUB+AMY resultaram em valores intermediários para a incidência de diarreia, sem diferenças significativas entre elas ($P = 0,054$).

3.2 Morfometria intestinal

No duodeno, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as dietas em relação à altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas (PC) e relação vilo: cripta (AV:PC) (Tabela 6). No entanto, no jejuno, os leitões alimentados com as dietas CP e AMY apresentaram valores maiores de AV:PC ($P < 0,05$) em comparação aos leitões do grupo CN (Tabela 6).

No íleo, a AV e a PC não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$), porém, a relação AV:PC foi maior ($P < 0,05$) nos leitões alimentados com as dietas CP e SUB+AMY em comparação aos que receberam a dieta CN, (Tabela 6).

3.3 Expressão gênica

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as dietas para a expressão dos genes HAP, IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF e OCL no jejuno dos leitões (Tabela 7). No entanto, foi verificado aumento ($P < 0,05$) na expressão do gene IL-10 dos leitões alimentados com as dietas CP e AMY, em comparação com o grupo CN (Tabela 7). A expressão dos genes

relacionados à integridade da barreira intestinal, como Ocludina (OCL) e Zonula occludens (ZO-1), não apresentou diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi investigada a hipótese de que a inclusão de probiótico na dieta melhora, de forma semelhante ao óxido de zinco, o desempenho, a morfologia e integridade epitelial do intestino e diminui a ativação do sistema imunológico de leitões desmamados aos 21 dias de idade. O ZnO, amplamente utilizado na produção de suínos, é reconhecido pela sua eficácia na redução da diarreia pós-desmame e na melhora do crescimento. No entanto, devido às preocupações ambientais associadas ao seu uso prolongado, alternativas como os probióticos têm ganhado cada vez mais espaço (Jensen et al., 2016).

Observou-se, neste estudo, que as dietas contendo *Bacillus subtilis* (SUB) ou óxido de zinco (CP) influenciaram positivamente a conversão alimentar (CA) dos leitões. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre as dietas, foi identificada uma tendência de melhora na CA em ambos os grupos.

Os leitões alimentados com a dieta CP apresentaram maior peso final em relação aos leitões alimentados com as demais dietas e uma redução de 14% na CA em comparação com a média dos demais grupos. Esses resultados estão coerentes com outros estudos nos quais a inclusão de ZnO em níveis farmacológicos (2500 ppm a 3000 ppm) aumentou o peso corporal e reduziu a conversão alimentar de leitões aos 35 dias de idade (Zhu et al., 2017; Papadomichelakis et al., 2023; Wang et al., 2023).

Estudos recentes indicam que os probióticos, como *Bacillus subtilis*, podem influenciar positivamente a eficiência alimentar ao promover a integridade intestinal e melhorar a digestão e absorção de nutrientes (Zhu et al., 2022; Hu et al., 2024). Neste estudo, nos leitões suplementados com *Bacillus subtilis*, a tendência de melhoria na CA pode ser explicada pelo impacto positivo dos probióticos na modulação da microbiota intestinal, resultando em um ambiente mais saudável e favorável à absorção de nutrientes (Wang et al., 2020a).

Os resultados positivos acima podem ser atribuídos à melhora na taxa de diarreia, que geralmente está associada a resultados positivos de desempenho dos animais (Hu et al., 2014; Tian et al., 2021). Os leitões alimentados com a dieta CP apresentaram menor escore fecal,

bem como redução numérica de 50% na incidência de diarreia, em relação à média dos demais grupos para esta variável.

Além de uma possível melhoria da saúde intestinal dos leitões, a suplementação com probióticos resultou em escores fecais intermediários em comparação aos grupos CN e CP, acompanhados por uma redução numérica de 27% na incidência de diarreia em relação ao grupo CN. Embora essa suplementação não tenha influenciado diretamente o desempenho dos leitões, conforme observado em estudos de Luise et al. (2019) e Satessa et al. (2020), os resultados sugerem que os probióticos podem ter papel relevante na minimização da ocorrência de diarreia.

O impacto positivo na altura das vilosidades e na profundidade das criptas, resultou em maior relação vilo:cripta no jejuno e no íleo dos leitões alimentados com as dietas AMY e SUB + AMY. Essa melhoria na morfologia intestinal, reforça o papel dos probióticos na promoção da integridade da barreira intestinal, auxiliando na digestão e na absorção de nutrientes, conforme destacado por Shang et al. (2020) e Wang et al. (2020a). Esses resultados corroboram os da literatura, que sugere que os probióticos desempenham papel central na manutenção da saúde intestinal, favorecendo o bem-estar dos animais e minimizando os efeitos negativos da disbiose intestinal (Pereira et al., 2022). Estudos recentes têm demonstrado que espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* são eficazes na modulação da microbiota intestinal, contribuindo para a melhoria da integridade intestinal e para a redução de patógenos (Zhu et al., 2022; Azizi et al., 2022).

Além dos benefícios na digestão e absorção de nutrientes, a suplementação com *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* também exerceu um impacto positivo no sistema imunológico dos leitões. Os resultados de expressão gênica indicaram aumento significativo na expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, essencial para a modulação da resposta imune. Esse efeito imunomodulador reforça a capacidade dos probióticos de não só melhorar a saúde intestinal, mas também de minimizar os efeitos negativos do estresse pós-desmame, como inflamação acentuada e comprometimento da barreira epitelial (Luise et al., 2021). Dessa forma, a combinação de benefícios digestivos e imunológicos destaca o papel dos probióticos como uma alternativa eficaz ao óxido de zinco, especialmente na promoção da saúde intestinal e na modulação da resposta imune (Rodriguez et al., 2021). Esses resultados são consistentes com os de outros estudos que mostram que probióticos como *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* podem não apenas regular a

resposta inflamatória, mas também promover a integridade da barreira intestinal, favorecendo a saúde geral do trato digestivo dos leitões (Hu et al., 2023).

A ausência de efeitos significativos na expressão de genes relacionados à integridade da barreira intestinal, como ocludina e zonula occludens (ZO-1), sugere que os probióticos atuam principalmente por vias imunomoduladoras, em vez de afetarem diretamente esses marcadores de integridade (Azizi et al., 2022). Essa atuação indireta, no entanto, não compromete a eficiência da barreira intestinal, como evidenciado pela melhoria na morfologia intestinal e na relação vilo:cripta, o que reflete uma função de barreira mais eficiente, modulada pela regulação da microbiota e pela redução da inflamação. Nesse contexto, a suplementação com probióticos se mostra mais eficaz na promoção de uma resposta anti-inflamatória, como demonstrado pelo aumento de IL-10, do que na supressão direta de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , que não apresentaram diferenças entre os grupos (Pereira et al., 2022). Reforçando o fato de que os probióticos ajudam a criar um ambiente intestinal menos suscetível à inflamação crônica, sem interferir nas respostas imunes normais, destacando seu papel na manutenção da saúde intestinal e imunológica dos leitões.

A suplementação com probióticos não confirma a hipótese de que a inclusão deste aditivo na dieta melhora, de forma semelhante ao óxido de zinco, o desempenho de leitões recém desmamados. A ausência de efeitos positivos dos probióticos no desempenho dos leitões pode estar relacionada a vários fatores, incluindo a composição da dieta, a diversidade de espécies de *Bacillus*, a quantidade administrada, a fase de vida dos suínos e as características do ambiente em que os animais estão inseridos (Liu et al., 2018; Mingmongkolchai & Panbangred, 2019). No entanto, a adição de *Bacillus amyloliquefaciens* pode melhorar a saúde intestinal e a absorção de nutrientes em leitões recém-desmamados.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com *Bacillus amyloliquefaciens*, isoladamente ou em combinação com *Bacillus subtilis*, melhora a relação vilo:cripta no jejuno e íleo e reduz a incidência de diarreia em leitões recém-desmamados. Além disso, esses probióticos aumentam a expressão do gene anti-inflamatório IL-10, evidenciando seu potencial para melhorar a saúde intestinal dos 21 aos 35 dias de idade.

6 REFERÊNCIAS

Baholet, D.; Skalickova, S.; Weisbauerova, E.; Batik, A., Kolackova, I., Nevrkla, P., & Horky, P. Short-term supplementation of zinc nanoparticles in weaned piglets affects zinc bioaccumulation and carcass classification. **Livestock Science**, v. 270, 2023.

Barba-Vidal, E., Martín-Orúe, S. M., & Castillejos, L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A Review. **Livestock Science**, v. 223, p.84-96, 2019.

Bednorz, C., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Hartmann, S., Neumann, K., Pieper, R., Bethe, A., Semmler, T., Tedin, K., Schierack, P., Wieler, L. H., & Guenther, S. The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 396–403, 2013.

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

Chen, H., Chen, D., Qin, W., Liu, Y., Che, L., Huang, Z., Luo, Y., Zhang, Q., Lin, D., Liu, Y., Han, G., DeSmet, S., Michiels, J. Wheat bran components modulate intestinal bacteria and gene expression of barrier function relevant proteins in a piglet model. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, p.65-72, 2017.

Cho, J. H., Upadhaya, S. D., & Kim, I. H. Effects of dietary supplementation of modified zinc oxide on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, fecal microbial shedding and fecal score in weanling pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, p. 617–623, 2015.

Dębski, B. Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, p. 917–924, 2016.

Deng, J.; Li, Y.; Zhang, J., & Yang, Q. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p.62–68, 2013.

Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. **Microbiology**, v. 16, p. 284–292, 2013.

Giannenas, I., Doukas, D., Karamoutsios, A., Tzora, A., Bonos, E., Skoufos, I., Tsinas, A., Christaki, E., Tontis, D., & Florou-Paneri, P. Effects of *Enterococcus faecium*, mannan oligosaccharide, benzoic acid and their mixture on growth performance, intestinal microbiota, intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.220, p. 159–167,2016.

Grilli, E.; Tugnoli, B.; Vitari, F.; Domeneghini, C.; Morlacchini, M.; Piva, A., et al. Low doses of microencapsulated zinc oxide improve performance and modulate the architecture of the ileum, the expression of inflammatory cytokines and tight junctions in weaned piglets. **Animals**, 2018.

Guan, X.; Santos, R. R.; Kettunen, H.; Vuorenmaa, J., & Molist, F. Effect of Resin Acid and Zinc Oxide on Immune Status of Weaned Piglets Challenged with *E. coli* Lipopolysaccharide. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.

Hong, H. A., Le, H. D., & Cutting, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813–835,2005.

Hu, C. H., Xiao, K., Song, J., & Luan, Z. S. Effects of zinc oxide supported on zeolite on growth performance, intestinal microflora and permeability, and cytokines expression of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 181, p. 65–71, 2018.

Hu, Y., Dun, Y., Li, S., Zhao, S., Peng, N., & Liang, Y. Effects of *Bacillus subtilis* kn-42 on growth performance, diarrhea and fecal bacterial flora of weaned piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, p. 1131–1140,2014.

Jensen, J., Larsen, M. M., & Bak, J. National monitoring study in Denmark finds increased and critical levels of copper and zinc in arable soils fertilized with pig slurry. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 334–340,2016.

Jiang, Z., Su, W., Li, W., Wen, C., Du, S., He, H., Zhang, Y., Gong, T., Wang, X., Wang, Y., Jin, M., & Lu, Z. *Bacillus amyloliquefaciens* 40 regulates piglet performance, antioxidant capacity, immune status and gut microbiota. **Animal Nutrition**, v.12, p.116–127,2023.

Jones, S. E.; Versalovic, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **Microbiology**, v.9, p.1-9, 2009.

Kummer, R.; Antônio, M., Gonçalves; D., Lippke; R. T., Ferreira Passos; B. M., Marques; P., Tiago, & Mores, J. Factors associated with nursery pig performance. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 195-209,2009.

Lei, X. J., & Kim, I. H. Low dose of coated zinc oxide is as effective as pharmacological zinc oxide in promoting growth performance, reducing fecal scores, and improving nutrient digestibility and intestinal morphology in weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.245, p. 117–125, 2018.

Liao, S.F., Nyachoti, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. **Animal Nutrition**, v.32, p. 331-343,2017.

Liu, P., Piao, X.S., Thacker, P.A., Zeng, Z.K., Li, P.F., Wang, D., Kim, S.W. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K881. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3871-3879,2010.

Liu, Y.; Espinosa, C.D.; Abelilla, J.J.; Casas, G.A.; Lagos, L.V.; Lee, S.A.; Kwon, W.B.; Mathai, J.K.; Navarro, D.M.D.L.; Jaworski, N.W. et al. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. **Animal Nutrition**, v.4, p.113-125,2018.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p.402-408. 2001.

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. Mixed organic acids as antibiotic substitutes improve performance,

serum immunity, intestinal morphology and microbiota for weaned piglets. **Animal Feed Science Technology**, v. 235, p. 23-32,2018.

Luise, D.; Bertocchi, M.; Motta, V.; Salvarani, C., Bosi P.; Luppi, A.; Fanelli, F.; Mazzoni, M., Archetti, I., Maiorano, G., Nielsen, B.K.K., Trevisi, P. Bacillus sp. probiotic supplementation diminish the Escherichia coli F4ac infection in susceptible weaned pigs by influencing the intestinal immune response, intestinal microbiota and blood metabolomics. **Journal Animal Science Biotechnology**, v.10, 74,2019.

Mingmongkolchai, S., Panbangred, W. Display of Escherichia coli phytase on Bacillus subtilis spore surface using CotG as anchor protein. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.187, p. 838–855, 2019.

Papadomichelakis, G., Palamidi, I., Paraskeuas, V. V., Giamouri, E., & Mountzouris, K. C. Evaluation of a Natural Phytogenic Formulation as an Alternative to Pharmaceutical Zinc Oxide in the Diet of Weaned Piglets. **Animals**, v.13, 2023.

Pié, S.; Lallès, J.P.; Blazy, F.; Laffitte, J.; Sève, B.; Oswald, I.P. Weaning is associated with an upregulation of inflammatory cytokine expression in the intestine of piglets. **Journal Nutrition.**, v. 7, p. 634 – 641, 2004.

Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Bosi, P., Oswald, I., & Mengheri, E. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. **Animal Research**, v.54, p. 203–218,2005.

Ross, G. R.; Gusils, C.; Oliszewski, R.; Holgado, S. C; González, S.N 2010. Effects of probiotic administration in swine. **Animal Feed Science and Technology**, v. 109, p.545-549,2010.

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; De Oliveira, R. F. M.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 251p. 2011.

Satessa, G. D., Kjeldsen, N. J., Mansouryar, M., Hansen, H. H., Bache, J. K., & Nielsen, M. O. Effects of alternative feed additives to medicinal zinc oxide on productivity, diarrhoea incidence and gut development in weaned piglets. **Animal**, v.14, p. 1638–1646,2020.

Shen, J., Chen, Y., Wang, Z., Zhou, A., He, M., Mao, L., Zou, H., Peng, Q., Xue, B., Wang, L., Zhang, X., Wu, S., & Lv, Y. Coated zinc oxide improves intestinal immunity function and regulates microbiota composition in weaned piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 2123–2134, 2014.

Slifierz, M. J., Friendship, R., & Weese, J. S. Zinc oxide therapy increases prevalence and persistence of methicillin-resistant staphylococcus aureus in pigs: A randomized controlled trial. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, p. 301–308,2015.

Smith F, Clark JE, Overman BL, Tozel CC, Huang JH, Rivier JEF, Blisklager AT, Moeser AJ. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. **Animal Journal Physiology - Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, p. 352-363,2010.

Song, Z. H., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H. Zinc oxide influences mitogen-activated protein kinase and TGF-beta 1 signaling pathways, and enhances intestinal barrier integrity in weaned pigs. **Innate Immunity**, v.21, p.341–348, 2015.

Sun, Y., Ma, N., Qi, Z., Han, M., & Ma, X. Coated Zinc Oxide Improves Growth Performance of Weaned Piglets via Gut Microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

Tian, Z., Wang, X., Duan, Y., Zhao, Y., Zhang, W., Azad, M. A. K., Wang, Z., Blachier, F., & Kong, X. Dietary Supplementation with *Bacillus subtilis* Promotes Growth and Gut Health of Weaned Piglets. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7,2021.

Valente Júnior, D. T., Rodrigues, G. A., Soares, M. H., Silva, C. B., Frank, E. O., Gonzalez-Vega, J. C., Htoo, J. K., Brand, H. G., Silva, B. A. N., & Saraiva, A. Supplementation of

Bacillus subtilis DSM 32540 improves performance and intestinal health of weaned pigs fed diets containing different fiber sources. *Livestock Science*, v.270, 2023.

Van Zyl, W. F., Deane, S. M., & Dicks, L. M. T. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. ***Gut Microbes***, v. 12, 2020.

Wang, H., Yu, S. J., & Kim, I. H. Evaluation on the Growth Performance, Nutrient Digestibility, Fecal Microbiota, Noxious Gas Emission, and Fecal Score on Weaning Pigs Supplement with and without Probiotics Complex Supplementation in Different Level of Zinc Oxide. ***Animals***, v.13,2023.

Wang, Y., Wu, Y., Wang, B., Cao, X., Fu, A., Li, Y., & Li, W. Effects of probiotic *Bacillus* as a substitute for antibiotics on antioxidant capacity and intestinal autophagy of piglets. ***Animals***, v. 7, 2017.

Yang, K.M., Jiang, Z.Y., Zheng, C.T., Wang, L., Yang, X.F. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K881. ***Journal of Animal Science***, v.92, p. 1496-1503,2014.

Zhu, C., Lv, H., Chen, Z., Wang, L., Wu, X., Chen, Z., Zhang, W., Liang, R., & Jiang, Z. Dietary Zinc Oxide Modulates Antioxidant Capacity, Small Intestine Development, and Jejunal Gene Expression in Weaned Piglets. ***Biological Trace Element Research***, v. 175, p. 222-234, 2017.

TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.

Ingrediente, %	CN	CP	SUB	AMY	SUB+AMY
Milho	45,620	45,620	45,620	45,620	45,620
Farelo de soja	17,500	17,500	17,500	17,500	17,500
Soro de leite	16,000	16,000	16,000	16,000	16,000
Soja micronizada	10,500	10,500	10,500	10,500	10,500
Plasma sanguíneo	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
Fosfato bicálcico	1,380	1,380	1,380	1,380	1,380
Óleo de soja	1,650	1,650	1,650	1,650	1,650
Calcário	1,360	1,360	1,360	1,360	1,360
Inerte	0,400	0,090	0,350	0,300	0,325
L-lisina	0,410	0,410	0,410	0,410	0,410
Mistura vitamínica ¹	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
L-treonina	0,247	0,247	0,247	0,247	0,247
DL-metionina	0,207	0,207	0,207	0,207	0,207
Mistura mineral ²	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
L-valina	0,103	0,103	0,103	0,103	0,103
Sal	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
L-triptofano	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048
Óxido de zinco	---	0,310	---	---	---
Gutplus [®]	---	---	0,050	---	0,025
Ecobio1 [®]	---	---	---	0,100	0,050

¹ Conteúdo por quilo de produto: selênio (75,0 mg), ácido fólico (250,0 mg), niacina (8750,0 mg), biotina (37,50 mg), ácido pantotênico (5000,0 mg), vitamina A (2000,0 UI), vitamina B1(500,0 mg), vitamina B12 (7500,0 mcg), vitamina B2 (1500,0 mg), vitamina B6(500,0 mg), vitamina D3 (375.000,0 UI), vitamina E (6250,0 UI), vitamina K3 (750,0 mg).

² Teor por quilo de produto: Zn (25,0 g), Cu (40,0 g), Fe (15,0 g), Mn (13,0 g), I (350,0 mg).

Tabela 2 - Composição nutricional calculada das dietas experimentais³.

Itens	CN	CP	SUB	AMY	SUB+AM Y
Energia metabolizável kcal/kg	3.400	3.400	3.400	3.400	3.400
Proteína bruta, %	21,50	21,50	21,50	21,50	21,50
Cálcio, %	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Fósforo disponível, %	0,528	0,528	0,528	0,528	0,528
Sódio, %	0,230	0,230	0,230	0,230	0,230
Zinco, mg/kg	0,002	2500	0,002	0,002	0,002
Lactose, %	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Lisina digestível, %	1,450	1,450	1,450	1,450	1,450
Met +Cis digestível, %	0,813	0,813	0,813	0,813	0,813
Treonina digestível, %	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972
Triptofano digestível, %	0,276	0,276	0,276	0,276	0,276
Valina digestível, %	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Isoleucina digestível, %	0,798	0,798	0,798	0,798	0,798

³ Valores calculados de acordo com Rostagno et al. (2011).

Tabela 3 - Desenho dos *primers*.

Gene	Número do GenBank	Sequência	Tamanho, bp
TNF- α	NM_214022.1	F:CATCGCCGTCTCCTACCA R:CCCAGATTCAGCAAAGTCCA	199
IL-1 β	NM_214055.1	F:TCTGCCCTGTACCCCAACTG R:CCCAGGAAGACGGGCTTT	132
IL-6	NM_001252429.1	F:CCTGTCCACTGGGCACATAAC R:CAAGAAACACCTGGCTCTGAAAC	253
HAP	NM_214000.2	F:GCTAAGAATCTCCGCTTGG R:CAATCTCCACCTCCTGTTC	100
IL-10	NM_214041.1	F:GAAGGACCAGATGGGCGACTT R:CACCTCCTCCACGGCCCTTG	256
TGF β	NM_214015.1	F:GGACCTTATCCTGAATGCCTT R:TAGGTTACCACTGAGCCACAAT	133
Ocludina	NM_001163647.1	F:TCCTGGGTGTGATGGTGTTT R:CGTAGAGTCCAGTCACCGCA	145
ZO-1	XM_003353439.2	F:AAGCCCTAAGTTCAATCACAATCT R:ATCAAACCTCAGGAGGCGGC	130
ACTB	XM_003124280.3	F:CTTCTAGGCGGACTGTTAGTG R:TGTCGGCGATGCCTGGGTA	123

TNF α – fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β - interleucina 1 beta; IL-6 - interleucina 6; HAP – haptoglobina; IL-10 - interleucina 10; TGF- β – fator transformador de crescimento beta 1; ZO-1 - Zonula occludens-1; ACTB: Beta-actina. F e R indicam primers forward e reverse, respectivamente.

Tabela 4 - Efeito da suplementação com probióticos no desempenho de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.

Itens	CN	CP	SUB	AMY	SUB+AMY	EPM	P-valor
Peso inicial, kg	6,77	6,83	6,79	6,74	6,80	–	–
GPD, kg/dia	0,211	0,243	0,234	0,215	0,199	0,008	0,350
CRD, kg/dia	0,296	0,330	0,303	0,306	0,302	0,008	0,665
CA	1,42	1,26	1,39	1,55	1,54	0,036	0,054
Peso final, kg	9,74 ^b	10,82 ^a	9,86 ^b	9,71 ^b	9,73 ^b	0,190	0,033

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste SNK. CN, controle negativo (sem óxido de zinco e sem probióticos); CP, controle positivo (CN + 2500 mg/kg de ZnO); SUB, (CN + 500 g/Ton de GutPlus[®]); AMY (CN + 1000 g/Ton de Ecobiol[®]); SUB+AMY (CN + 250 g/Ton de GutPlus[®] + 500 g/Ton de Ecobiol[®]); EPM: Erro padrão da média; GPD: Ganho de peso diário; CRD: Consumo de ração diário; CA: Conversão alimentar.

Tabela 5 - Efeito da suplementação com probióticos no escore fecal e na incidência de diarreia de leitões dos 21 aos 35 dias de idade.

Itens	CN	CP	SUB	AMY	SUB+AMY	EPM	<i>P-valor</i>
Escore fecal	1,99 ^a	1,27 ^b	1,63 ^{ab}	1,67 ^{ab}	1,78 ^{ab}	0,023	0,042
Incidência de diarreia (%)	18,09	7,14	12,62	12,38	14,52	1,175	0,054

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste SNK. CN, controle negativo (sem óxido de zinco e sem probióticos); CP, controle positivo (CN + 2500 mg/kg de ZnO); SUB, (CN + 500 g/Ton of GutPlus[®]); AMY, (CN + 1000 g/Ton of Ecobiol[®]); SUB+AMY (CN + 250 g/Ton of GutPlus[®] + 500 g/Ton of Ecobiol[®])

EPM: Erro padrão da média. Escore fecal: 1 = sólido; 2 = semi-sólido; 3 = semi-líquido; 4 = líquido.

Tabela 6 - Morfometria intestinal de leitões dos 21 aos 35 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com probióticos.

Ítems	CN	CP	SUB	AMY	SUB+AMY	EPM	P-valor
Duodeno							
AV, μm	328	362	356	350	364	5,979	0,327
PC, μm	270	272	248	254	272	5,125	0,410
AV: PC	1,25	1,36	1,37	1,44	1,43	0,028	0,136
Jejuno							
AV, μm	272	327	306	312	308	6,946	0,148
PC, μm	199	190	206	187	200	4,840	0,747
AV:PC	1,38 ^b	1,77 ^a	1,51 ^{ab}	1,72 ^a	1,57 ^{ab}	0,042	0,017
Íleo							
AV, μm	234	264	276	269	272	5,588	0,125
PC, μm	171	170	195	186	174	4,303	0,282
AV: PC	1,40 ^b	1,64 ^a	1,47 ^{ab}	1,51 ^{ab}	1,61 ^a	0,029	0,036

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste SNK. CN, controle negativo (sem óxido de zinco e sem probióticos); CP, controle positivo (CN + 2500 mg/kg de ZnO); SUB (CN + 500 g/Ton of GutPlus[®]); AMY, (CN + 1000 g/Ton of Ecobiol[®]); SUB+AMY (CN + 250 g/Ton of GutPlus[®] + 500 g/Ton of Ecobiol[®]); EPM: Erro padrão da média; AV: altura de vilosidade, PC: profundidade de cripta; AV:PC: relação altura vilosidade/profundidade de cripta.

Tabela 7 - Expressão gênica de citocinas e proteínas de junção no jejuno de leitões de 35 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com probióticos.

Itens	CN	CP	SUB	AMY	SUB+AMY	EPM	<i>P-valor</i>
HAP	1,058	1,266	0,999	1,002	0,885	1,009	0,231
IL-1 β	0,153	0,145	0,174	0,213	0,172	0,090	0,147
IL-6	0,043	0,046	0,041	0,041	0,051	0,185	0,658
IL-10	0,196 ^b	0,313 ^a	0,178 ^b	0,242 ^{ab}	0,155 ^b	0,020	0,019
TGF- β	2,246	2,476	2,544	2,090	2,387	0,008	0,745
TNF	0,196	0,170	0,224	0,235	0,274	0,201	0,631
OCL	5,202	5,847	6,388	6,785	5,838	0,152	0,619
ZO	3,579	3,817	4,285	4,809	3,888	2,387	0,850

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste SNK. HAP – haptoglobina; IL-1 β - interleucina 1 beta; IL-6 - interleucina 6; IL-10 - interleucina 10; TGF- β – fator transformador de crescimento beta; TNF α – fator de necrose tumoral alfa ; OCL- Ocludina; ZO-1 - Zonula occludens-1.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
 CEUAP/UFV

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36370-900 - Telefone: (31) 3899.3273 - e-mail: ceup@ufv.br - site: www.ceup.ufv.br

Viçosa, 04 de agosto de 2022

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Probiótico como alternativa ao óxido de zinco na dieta de leitões dos 21 aos 35 dias de idade", protocolo n° 074/2022, sob a responsabilidade de Alysson Saraiva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) em reunião de 04 de agosto de 2022.

Data de Aprovação: 04 de agosto de 2022 Finalidade: (x)Pesquisa ()Ensino Vigência do Projeto: de 08 de setembro de 2022 a 15 de Novembro de 2022 Espécie/linhagem: Suíno (*Sus scrofa domesticus*) Nº de animais: 150
 Peso: 6 Kg Idade: 21 dias Sexo: Macho/Fêmea Origem: Setor Suinocultura - DZO /UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "Probiotic as alternative to zinc oxide in diets of piglets from 21 to 35 days of age", protocol n° 074/2022, under the responsibility of Alysson Saraiva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law n°. 11.794, of October 8, 2008, Decree n°. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on Aug. 04th of 2022.

Approval Date: Aug. 04th of 2022 Finality: (x)Research ()Education
 Duration of the Project: from Sep. 08th of 2022 to Nov. 15th, 2022.
 Species / strain: Pig (*Sus scrofa domesticus*) Nº of animals: 150
 Weight: 6 Kg Age: 21 days Sex: Male/Female Source: Setor Suinocultura - DZO /UFV - CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96

Luciana Navajas Rennó
 Coordenadora da CEUAP/UFV