

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Matheus Dias Araújo

**Avaliação do ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais no controle de
*Brachyspira hyodysenteriae***

Belo Horizonte
2024

Matheus Dias Araújo

**Avaliação do ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais no controle de
*Brachyspira hyodysenteriae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte

2024

A663a Araújo, Matheus Dias, 1988-
Avaliação do ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais
no controle de *Brachyspira hyodysenteriae*/ Matheus Dias Araújo. – 2024.
97f: il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes
Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal

Área de concentração: Patologia Animal

Bibliografia: f. 59 – 76.

1. Suíno - Doenças - Teses - 2. Diarreia em animais - Teses - I. Guedes,
Roberto Maurício Carvalho – II. Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MATHEUS DIAS ARAUJO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovado(a) em 23 de fevereiro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Roberto Mauricio Carvalho Guedes - Orientador(a)

Dr.(a). Carlos Augusto Gomes Leal

Dr.(a). Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dr.(a). Aline de Marco Viott

Dr.(a). Adso Adami dos Passos



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2024, às 21:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2024, às 08:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adso Adami dos Passos, Usuário Externo**, em 27/02/2024, às 08:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline de Marco Viott, Usuário Externo**, em 27/02/2024, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Gomes Leal, Membro**, em 28/02/2024, às 05:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3054501** e o código CRC **6778CE7F**.

Agradecimentos

Após 11 anos de UFMG, fica muito difícil agradecer de forma justa a todos àqueles que participaram de uma construção tão longa e que culminou nessa tese. Mas ainda assim, algumas pessoas se destacam, não só pelo tempo despendido durante esse percurso, mas por diversas ações e atitudes, pela participação ativa, pelo companheirismo e pelos ensinamentos, então, seguem algumas pessoas, não por ordem de importância, mas talvez pela ordem das memórias.

Àquele que foi uma grande inspiração e fonte de conhecimentos, que me estimulou a conhecer novos campos e, anos depois, aceitou meu retorno, um muito obrigado Prof. Roberto Guedes. A liberdade que me proporcionou ao escolher e aprender novas habilidades, a confiança no meu serviço e as considerações feitas durante esse percurso permitiram que eu visse a pós-graduação como um ambiente de aprendizado e desenvolvimento ímpar.

Aos meus pais, que mesmo não entendendo os motivos das inúmeras horas dentro do laboratório, das noites mal dormidas e da correria incessante para atender alguns prazos, jamais criticaram ou minimizaram minhas escolhas.

Aos melhores amigos que alguém poderia querer, alguns nomes são, e devem ser, sinônimo de parceria, comprometimento e, acima de tudo, amizade: Sóstenes, Leonardo, Matheus, Lucas, Glauber, Glauco, Alberto, Samuel, Douglas e Marcelo. Conselhos e puxões de orelha, brincadeiras e, na grande maioria das vezes, a mão amiga que era necessária no momento da dificuldade, pessoas que desprenderam não só tempo, mas sentimentos e dificuldades comigo, eu não tenho palavras para agradecer.

Se o objetivo fosse agradecer nominalmente cada pessoa que foi importante, provavelmente essa tese teria mais de mil páginas. Mas, às técnicas Valéria e Leimar, que muitas vezes me ajudaram, desafogando um pouco o serviço.

À Amanda, por todo esse período, onde participou ativamente desde o início do mestrado até o fim do doutorado, agradeço de coração, pois o cultivo de *Brachyspira* e todas as técnicas envolvidas não seriam possíveis sem sua orientação e auxílio.

Aos companheiros de laboratório, que sempre buscaram participar e auxiliar nos experimentos, e, juntamente ao GES, tornaram essa tese algo factível. Um muito obrigado de coração!

Às inúmeras pessoas que fazem muito, mas pouco vistas, como Vita, Lucas, Patrick, Carlão, João. Todos ajudaram de forma indireta, muitas vezes apenas conversando e tornando aquele dia mais leve e agradável!

Não poderia deixar de agradecer àqueles que doaram a vida ou algo de seus corpos para que eu pudesse concluir esse experimento. Aos mais de 50 animais utilizados para esse e outros experimentos, ao Fogo, grande doador de sangue, e aos ovinos, também doadores fiéis de sangue, um obrigado não só meu, mas de todos àqueles que um dia se beneficiaram de seu trabalho.

Um pedaço bem especial aos meus tão amados companheiros de quatro patas, dessa vez especialmente ao Thor, que seguiu para Valhalla, mas aos demais, Dalida, Lupin, Bia, Jedi, Pitty, Gabriela, Newt e Ray. Por muitas vezes, vocês foram a fagulha da mais sincera alegria, depois de um dia difícil e nebuloso.

Por fim, mas de longe, uma das maiores surpresas que esse doutorado me proporcionou, agradeço à minha companheira, Bárbara, que surgiu como uma estagiária de uma clínica de pequenos e se tornou uma das pessoas mais impactantes nesse processo, me trazendo paz e conforto quando necessário, caos e alegria quando as coisas estavam muito paradas. Você permitiu que eu enxergasse o que faltava em mim, e crescesse nessa falta. Sua visão de mundo, bem diferente da minha a princípio, se mostrou complementar, enquanto seu modo de trabalho algo inovador e, de certa forma, parecido comigo, ao se imergir completamente naquilo. Durante todo esse processo, não consigo me recordar de nenhum momento em que tenha me deixado só com meus problemas, para resolvê-los sozinho, exceto quando eu mesmo dizia que era assim que deveria ser. Não digo obrigado, pois não é o suficiente. Não tenho palavras, e só espero que, de certa forma, compreenda.

Um último agradecimento deve ser feito à Deus e todas as entidades que me acompanharam nesse percurso. A fé não é algo a ser explicado, só sentido, e eu senti sua ajuda, sempre que as coisas estavam pesadas demais.

"It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers."

Patrick Rothfuss, *The Wise Man's Fear*

Resumo

A justificativa para a redução dos promotores de crescimento antimicrobianos está relacionada ao aumento global da resistência antimicrobiana (AMR). Em resposta às políticas de controle de antimicrobianos, a pesquisa sobre alternativas nutracêuticas aumentou significativamente. O presente estudo visa avaliar a eficácia do ácido benzoico grau alimentar e sua combinação com óleos essenciais na inibição do crescimento de *B. hyodysenteriae* *in vitro* através da técnica de microdiluição em caldo. Além disso, investigamos os efeitos da suplementação desses produtos em suínos experimentalmente desafiados com *B. hyodysenteriae*, avaliando o quadro clínico de diarreia, ganho de peso, lesões macroscópicas e histológicas, excreção bacteriana e parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados *in vitro* demonstram atividade de inibição, capaz de impedir o crescimento antimicrobiano na concentração de 2500 µg/ml, em comparação à dose recomendada de 5000µg/ml, recomendada para a suplementação. Os resultados da suplementação *in vivo* não conseguiram reduzir lesões macro e microscópicas, nem escore clínico, com resultados intermediários para a excreção bacteriana fecal. Além disso, a suplementação não alterou o perfil de ganho de peso, contudo, houve uma alteração no perfil antioxidante de mucosa intestinal, com redução da atividade de superóxido dismutase e glutatona S-transferase em pelo menos um dos grupos suplementados. Os resultados *in vivo* indicam discreta atividade direta da suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais sobre a infecção por *B. hyodysenteriae*, contudo, pouco é conhecido sobre o perfil antioxidante intestinal suíno frente ao desafio por *B. hyodysenteriae* e à suplementação com ácidos orgânicos e óleos essenciais.

Palavras-chave: alternativas a antimicrobianos; nutracêutico; disenteria suína; MIC; redox.

Abstract

The demand for reduction of antimicrobial growth promoters in food animals is associated with the global increase in antimicrobial resistance (AMR). In response to antimicrobial control policies, research on nutraceutical alternatives has significantly increased. This study aims to evaluate the effectiveness of pure benzoic acid and its combination with essential oils in inhibiting the growth of *B. hyodysenteriae* *in vitro* using the broth microdilution technique. Additionally, we investigated the effects of supplementing these products in pigs experimentally challenged with *B. hyodysenteriae*, assessing clinical diarrhea, weight gain, macroscopic and histological lesions, bacterial excretion, and oxidative stress parameters. *In vitro* results demonstrate inhibitory activity capable of preventing antimicrobial growth at doses below supplementation recommendations. *In vivo* supplementation failed to reduce macro and microscopic lesions, clinical score, and showed intermediate results for fecal bacterial excretion. Furthermore, feed supplementation with pure or essential oil-combined benzoic acid did not alter the weight gain profile; however, there was a change in the antioxidant profile of the intestinal mucosa, with a reduction in superoxide dismutase and glutathione S-transferase activity in at least one of the supplemented groups. *In vivo* results indicate slight direct activity of supplementation with pure benzoic acid or in combination with essential oils on *B. hyodysenteriae* infection over the intestinal antioxidant activity. However, little is known about the swine intestinal antioxidant profile in the face of *B. hyodysenteriae* challenge and supplementation with organic acids and essential oils.

Keywords: antimicrobial alternatives; nutraceutical; swine dysentery; MIC; redox.

Lista de Figuras

Figura 1. Número de artigos encontrado no agregador PubMed com as palavras-chave "antimicrobial alternatives" em todo período de indexação (Data da busca: 12/01/2024)	17
Figura 2. Delineamento experimental in vivo	42
Figura 3. Curva de crescimento da cepa de <i>B. hyodysenteriae</i> , utilizada na inoculação, cultivada em caldo BHI + SFB.....	44
Figura 4. Dias com diarreia no período pós-inoculação por grupo (** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	49
Figura 5. Número de animais com diarreia no período pós-inoculação por dia (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	51
Figura 6. Ganho de peso antes (Gain_BI) e depois (Gain_AI) da inoculação (em Kg) (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	52
Figura 7. Escore composto (grau de lesão multiplicado pela extensão) de lesões macroscópicas avaliado pela análise de Skillings-Mack com <i>post-hoc</i> de Conover (** - $p < 0,01$; (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	53
Figura 8. Escore composto (multiplicação entre grau de lesão, distribuição e peso) de lesões histológicas por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo).....	55
Figura 9. Lesões histológicas individualizadas, por grupo (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	57
Figura 10. Excreção de material genético por grupo e dia pós-inoculação (A: -22dpi, B: -2dpi, C: 2dpi, D: 5dpi, E: 8dpi, e F: 14dpi) (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	58
Figura 11. Avaliação da atividade de CAT (em U/ml) (** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	61

Figura 12. Avaliação da atividade de GSH (em pmol/ml; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	62
Figura 13. Avaliação da atividade de GST (em mU/ml) (* - $p < 0,5$; *** $p < 0,001$; **** - $p < 0,00001$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	63
Figura 14. Avaliação da atividade de LPO (em mmol/ml) (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	64
Figura 15. Avaliação da atividade de NO_2 (em $\mu\text{M/ml}$) (* - $p < 0,05$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo).....	65
Figura 16. Avaliação da atividade de SOD (em U/ml) (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	66

Lista de tabelas

Tabela 1. Origem e ano de isolamento dos isolados de <i>B. hyodysenteriae</i> utilizados na avaliação <i>in vitro</i>	32
Tabela 2. Valores de MIC em µg/ml para cada cepa e princípio ativo, incluindo controle de diluente, pela técnica de microdiluição em caldo.....	33
Tabela 3. Composição percentual da ração para os grupos experimentais utilizada a partir do período de aclimação até a finalização do experimento (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	43
Tabela 4. Tabela de contingência para a avaliação geral de dias com diarreia (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo).....	48
Tabela 5. Tabela de contingência para avaliação diária de animais com diarreia (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	50
Tabela 6. Médias e Coeficiente de Variação (CV) para peso (Kg) e ganho de peso antes (BI) e depois (AI) da inoculação (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo).....	52
Tabela 7. Moda e Mediana de lesões macroscópicas por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo).....	54
Tabela 8. Moda e Mediana de lesões histológicas por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	55
Tabela 9. Moda para lesões histológicas individuais (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	56
Tabela 10. Mediana para lesões histológicas individuais (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	56
Tabela 11. Mediana por grupo do log de Ct após correção (Ct-43,258/-3,329) (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)	58

Tabela 12. Médias para enzimas Redox por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo) 60

Tabela 13. Desvio Padrão para enzimas Redox por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo) 60

Lista de Abreviaturas

AGP – Promotor de crescimento antimicrobiano

AMR – Resistência a antimicrobianos

BA – Ácido benzoico

BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais

BHI – *Brain Heart Infusion*

CAT – Catalase

CV – Coeficiente de variação

DPI – Dia pós-inoculação

DS – Desintéria suína

GSH – Sistema Glutathiona

GST – Glutathiona S-transferase

LPO – Peroxidação lipídica

MIC – Concentração mínima inibitória

NC – Controle Negativo

NO₂ – Óxido nítrico

PC – Controle Positivo

PCR – Reação em cadeia da polimerase

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

Redox – Atividade antioxidante

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido dismutase

Sumário

Introdução.....	16
Hipóteses.....	18
Objetivos	18
a. Gerais	18
b. Específicos.....	18
Revisão de literatura	20
Disenteria Suína	20
Resistência a antimicrobianos.....	22
Compostos alternativos a antimicrobianos	23
Capítulo 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais	27
1. Introdução.....	28
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Microrganismos.....	30
2.2. Diluição dos princípios ativos	31
2.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	31
3. Resultados.....	31
4. Discussão.....	33
Capítulo 2 – Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> do ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais em um desafio experimental com <i>B. hyodysenteriae</i>	37
1. Introdução.....	38
2. Material e métodos.....	40
2.1. Animais e delineamento experimental	40
2.2. Dieta	41
2.3. Preparo do inóculo e inoculação	43
2.4. Curva de crescimento.....	44

2.5.	Avaliação clínica e ganho de peso	45
2.6.	Avaliação anatomopatológica	45
2.7.	Histologia.....	45
2.8.	Atividade antioxidante de enzimas em raspado de mucosa.....	46
3.	Estatística	47
4.	Resultados.....	47
4.1.	Período pré-inoculação	47
4.2.	Escore clínico	47
4.3.	Ganho de peso.....	51
4.4.	Lesões macroscópicas	52
4.5.	Lesões histológicas	54
4.6.	qPCR.....	57
4.7.	Atividade de enzimas antioxidantes.....	59
5.	Discussão	67
	Conclusão geral	73
6.	Referências.....	74
	Anexo I – Figuras suplementares	92

Introdução

O Brasil ocupa posição de destaque na produção mundial de suínos, sendo o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo e um valor bruto de quase 32 bilhões de reais associados à produção (ABPA, 2023), sendo abatidos mais de 45 milhões de cabeças só no ano de 2022, das quais 1 milhão de toneladas foram exportadas para diversos países, principalmente asiáticos (ABPA, 2023). O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (AGP) pode ser um entrave para a exportação de produtos de origem animal para grandes mercados consumidores como a União Europeia e Estados Unidos, principalmente devido as políticas de redução ao uso de antimicrobianos na produção animal (THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003; USA FDA, 2015).

A justificativa para a redução dos AGP na produção animal é o aumento da resistência a antimicrobianos (AMR) por microrganismos (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2023), com indícios de que a AMR pode estar relacionada à essa ferramenta aplicada na produção (MARSHALL & LEVY, 2011). O Brasil tem desenvolvido medidas para controlar e restringir a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento nos últimos anos (BRASIL, 2012, 2016ab, 2017, 2020), e, apesar de existirem relatos dos impactos da retirada dos AGP na produtividade e mortalidade de suínos (WHO, 2003), as diferentes condições técnicas, sanitárias e ambientais entre a Dinamarca, país utilizado como referência para a produção de suínos livre de AGP, e o Brasil podem trazer insegurança na adoção dessas medidas.

Com o desenvolvimento das políticas de controle de AGP na produção animal, a pesquisa de substitutos aos antimicrobianos se desenvolveu bastante nos últimos anos, com diversas revisões abordando esse tema (ALLEN et al., 2013; STEVANOVIĆ et al., 2018; BALLOU et al., 2019; RAHMAN et al., 2022; ZHANG et al., 2023). O número de pesquisas publicadas envolvendo as palavras-chave “antimicrobial alternatives” no agregador de artigos PubMed, desde o início da indexação, (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> – data da busca: 12/01/2024) (Figura 1) demonstrou um crescimento vertiginoso nas últimas décadas, revelando os impactos que as políticas de restrições e relatos de AMR tiveram inclusive na ciência. Dentre as alternativas ao uso de antimicrobianos, os nutracêuticos têm posição de destaque, sendo os mais avaliados na comunidade científica a respeito da sua atividade antimicrobiana e promotora de crescimento.

Nutracêuticos podem ser definidos como alimentos funcionais que apresentem capacidade de prevenir ou tratar doenças e afecções (KALRA, 2003). Atualmente, existem inúmeros compostos que podem ser classificados como nutracêuticos, separados em diversas classificações, como: prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos, óleos essenciais, enzimas. Ainda hoje, os resultados

como promotores de crescimento desses compostos são controversos, principalmente por não haver consenso sobre princípios ativos, doses e associações entre princípios.

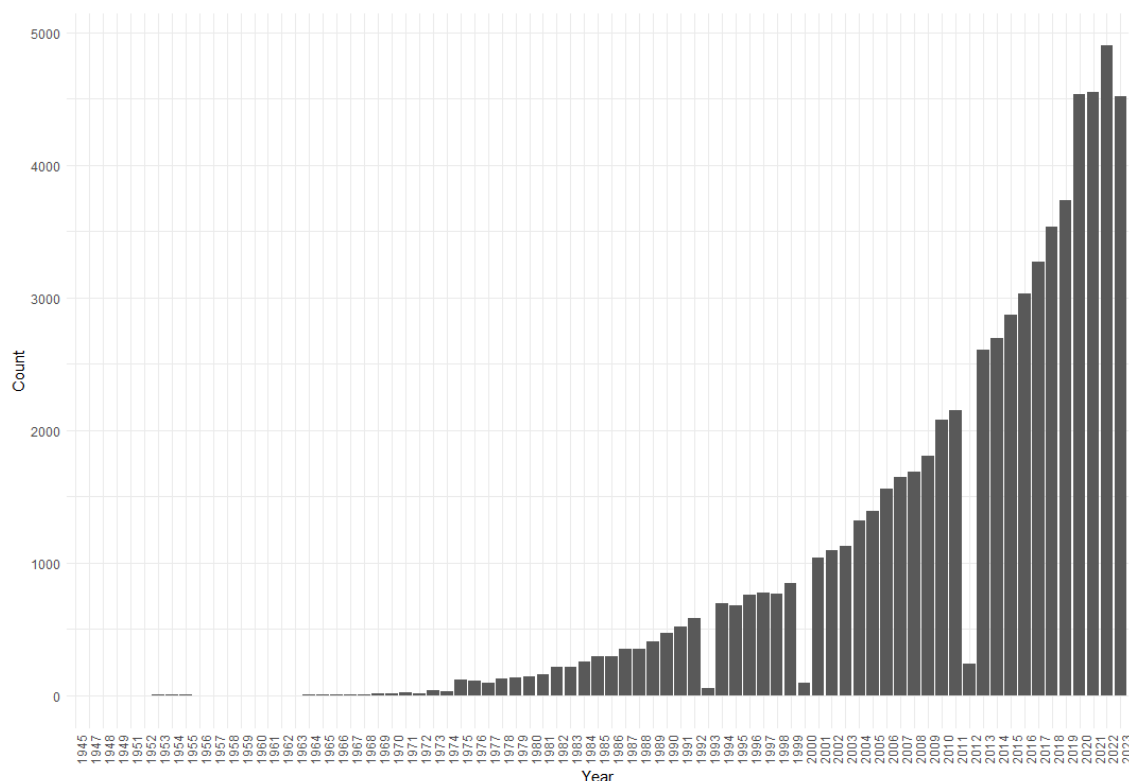


Figura 1. Número de artigos encontrado no agregador PubMed com as palavras-chave "antimicrobial alternatives" em todo período de indexação (Data da busca: 12/01/2024)

Ácidos orgânicos são moléculas de baixa acidez com baixa capacidade de dissociação em água (PANDA *et al.*, 2016). Seus mecanismos de ação antimicrobiana não são totalmente elucidados, sendo sugerido que sua forma dissociada consiga atravessar a parede bacteriana e, uma vez no citoplasma, cause destruição de organelas essenciais para o crescimento e multiplicação (MROZ, 2005). Óleos essenciais, por sua vez, são compostos bioativos extraído de diversas partes de plantas, sendo reconhecidas mais de 17 mil espécies vegetais com potencial produção de óleos essenciais (STEVANOVIĆ *et al.*, 2018).

Poucos estudos avaliaram os efeitos de nutracêuticos no controle da disenteria suína (DS), uma doença entérica que acomete suínos principalmente em fase de terminação (BERNARDEAU *et al.*, 2009; KUTASI *et al.*, 2016; VANDE MAELE *et al.*, 2016; DE NOVA *et al.*, 2017), sendo a grande maioria desses estudos realizada *in vitro*. O único agente causador da DS reportado no Brasil é a *B. hyodysenteriae*, mas são reconhecidas pelo menos mais duas espécies que podem causar a DS, *B. hamptonii* e *B. suanatina* (RUBIN *et al.*, 2013; MUSHTAQ *et al.*, 2015). A DS é uma doença caracterizada por uma diarreia mucohemorrágica severa, causando prejuízos à produção devido

aos gastos com tratamento, menor ganho de peso e mortalidade de animais (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013; HAMPSON & BURROUGH, 2019).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais na inibição do crescimento da *B. hyodysenteriae in vitro* e, em seguida, estudar os efeitos da suplementação *in vivo* em suínos experimentalmente desafiados com *B. hyodysenteriae*, buscando compreender os efeitos da suplementação no quadro clínico de diarreia, ganho de peso, desenvolvimento de lesões macroscópicas e histológicas, excreção bacteriana e parâmetros de estresse oxidativo intestinal.

Hipóteses

- 1- O ácido benzoico grau alimentar apresenta atividade antimicrobiana sobre a *B. hyodysenteriae* e é capaz de inibir e controlar quadros de disenteria suína, reduzindo sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas e excreção de bactérias pelas fezes, além de controlar alterações da atividade antioxidante no raspado de mucosa intestinal.
- 2- A associação do ácido benzoico grau alimentar com óleos essenciais é mais eficaz no controle da disenteria suína.

Objetivos

- a. Gerais
 - Determinar a concentração mínima inibitória do ácido benzoico grau alimentar e sua associação a óleos essenciais para a *B. hyodysenteriae*.
 - Determinar a eficácia da suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais no controle da disenteria suína em leitões experimentalmente infectados.
- b. Específicos
 - Determinar o valor da concentração mínima inibitória do ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais através da técnica de microdiluição em caldo.
 - Avaliar os efeitos da suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais no quadro clínico de diarreia causado pela *B. hyodysenteriae*.
 - Observar os efeitos da suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais sobre as lesões macro e microscópicas no cólon de leitões experimentalmente desafiados

- Quantificar, através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, a excreção bacteriana em animais suplementados com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais.
- Determinar os impactos da infecção pela *B. hyodysenteriae* na atividade de enzimas antioxidantes em raspado de mucosa em cólon aspiral, bem como os efeitos da suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais sobre essa atividade.
- Avaliar o ganho de peso antes e depois do desafio experimental com *B. hyodysenteriae* nos animais suplementados com ácido benzoico grau alimentar ou associado a óleos essenciais.

Revisão de literatura

Disenteria Suína

O gênero bacteriano *Brachyspira* compreende, atualmente, nove espécies reconhecidas. AS bactérias pertencentes a esse gênero são espiroquetas Gram-negativas móveis, flageladas e anaeróbias, das quais três podem ser consideradas patogênicas para suínos, *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. hamptonii* e *B. suanatina* (BURROUGH, 2017; HAMPSON, & BURROUGH, 2019). Dessas, a *B. hyodysenteriae* foi a primeira a ser identificada e é considerada o agente causador clássico da Disenteria Suína (DS) (MEYER *et al.*, 1974a).

Fenotipicamente, a *B. hyodysenteriae* é uma bactéria fortemente β -hemolítica, sem crescimento superficial no cultivo em ágar, com alguns isolados apresentando hemólise fraca (CARD *et al.*, 2019a; LA *et al.*, 2019; JOERLING *et al.*, 2020). O seu genoma é circular, com 3 milhões de pares de base e um plasmídeo de aproximadamente 36 mil pares de base, contendo mais de 2 mil sequências codificadoras de genes identificadas (BELLGARD *et al.*, 2009). Dentre esses genes, 11 estão relacionados a codificação de um agente de transferência de genes profago-like (GTA) conhecido como VSH-1 (Vírus *Serpulina hyodysenteriae*), que transfere fragmentos aleatórios de DNA entre cepas de *B. hyodysenteriae* (HUMPHREY *et al.*, 1997; MATSON *et al.*, 2005) cuja expressão é estimulada pela administração de antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (STANTON, *et al.*, 2008).

As variações genéticas descritas para a *B. hyodysenteriae* indicam que a espécie é bem conservada, com 88% dos genes comuns à todas as 20 cepas avaliadas (BLACK *et al.*, 2015). Ainda assim, estudos epidemiológicos com base na avaliação genômica permitem a clusterização e identificação de isolados regionais, podendo assim serem avaliados a evolução e transmissão de isolados entre diferentes regiões (SATO *et al.*, 2022).

Os fatores de virulência genômicos da *B. hyodysenteriae* não são completamente conhecidos, com algumas associações de genes de motilidade, proteases e peptidases. Contudo, grande parte desses estudos que visaram avaliar os fatores de virulência da *B. hyodysenteriae* focou apenas nos efeitos das hemolisinas produzidas por essa espécie (TER HUURNE, *et al.*, 1992; HYATT *et al.*, 1994; MAHU, *et al.*, 2016). Foram identificados sete genes relacionados a produção de hemolisinas, denominados hemolisina A (*tlyA*), hemolisina B (*tlyB*), hemolisina C (*tlyC*) (TER HUURNE, *et al.*, 1994) e uma proteína carreadora de grupo acilo que contém uma hemolisina B (*hlyA*), a hemolisina putativa III, formada por dois genes, e a hemolisina putativa CBS contendo domínio de proteína. A deleção dos genes que codificam a *tlyA* parece induzir lesões mais

brandas ou mesmo não causar lesões em animais experimentalmente inoculados (TER HUURNE, 1992; HYATT et al., 1994; LA et al., 2019; KEITH et al., 2022).

Genes de resistência a antimicrobianos já foram descritos e identificados no genoma da *B. hyodysenteriae* (KARLSSON et al., 1999; PRINGLE et al., 2004, 2007; CARD et al., 2018; LUCA et al., 2018). Diversas classes de antimicrobianos agem pela sua ligação a peptidil-transferase ribossomal, crucial na fase de alongamento da síntese proteica (DARBY et al., 2022). Dentre os antimicrobianos comumente utilizados no controle da *B. hyodysenteriae*, o macrolídeo Tilosina é o de menor susceptibilidade nos últimos anos (DANIEL et al., 2017; GARCÍA-MARTÍN et al., 2018; YEH et al., 2018), com concentrações inibitórias superando 128 µg/ml. A resistência associada a esse antimicrobiano ocorre em decorrência de uma mutação no 23S rRNA (OLSON, 1996; LA et al., 2003; RUWINI, 2021a) bacteriano, que altera o sítio de ligação tridimensional alvo para o princípio (KARLSSON et al., 1999). Um dos últimos genes de resistência identificados na *B. hyodysenteriae* está relacionado à resistência a pleuromutilinas, denominado *tvaA* (tiamulin valnemulin antibiotic) (CARD et al., 2018).

Diversos estudos avaliaram o perfil de sensibilidade à antimicrobianos do gênero *Brachyspira* no decorrer dos anos. HAMPSON et al. (2019), revisando os resultados desses estudos demonstram um aumento na resistência a antimicrobianos, incluindo cepas resistentes à múltiplos antimicrobianos. De acordo com os resultados encontrados, cerca de 58% a 100% das cepas avaliadas apresentavam perfil de resistência a lincomicina, enquanto para tilvalosina, entre 66% e 99,5%, sem que houvesse alguma tendência temporal para o aumento desse perfil de resistência. Para outros antimicrobianos avaliados (tiamulina e valnemulina) houve uma tendência temporal de aumento da resistência, chegando à 100% para ambos os princípios em alguns países (HAMPSON et al., 2019).

A patogênese da *B. hyodysenteriae* é praticamente desconhecida, em parte devido às dificuldades relacionadas à replicação do quadro clínico em condições experimentais (PARRA-AGUIRRE et al., 2022; 2023). Existem condições não totalmente conhecidas para que o desenvolvimento da DS, como a necessidade de um (ou mais) microrganismo como cofator, uma vez que animais gnotobióticos experimentalmente inoculados não desenvolvem a doença (MEYER et al. 1974ab, 1975). Conforme dito anteriormente, o quadro clínico da DS está relacionado a uma diarreia mucohemorrágica severa, contudo, as alterações intestinais mais marcantes são o aumento na produção e transporte de mucinas, que são fatores quimiotáticos para a *B. hyodysenteriae* (QUINTANA-HAYASHI et al., 2015, 2017; VENKATAKRISHNAN et al., 2017), havendo uma alteração no perfil de mucinas secretadas na luz intestinal, o que está

associado à alguns canais iônicos com a expressão reduzida em animais infectados (ENNS *et al.*, 2019).

O diagnóstico da DS se baseia nos dados clínicos observados de diarreia mucohemorrágica, associado a técnicas laboratoriais como isolamento e reação em cadeia da polimerase (PCR) (LA *et al.*, 2003; RUWINI, 2021ab). Alguns fatores podem influenciar o resultado de técnicas baseadas no isolamento do agente, ainda considerado método padrão para o diagnóstico (ACHACHA & MESSIER, 1992; OLSON, 1996; CALDERARO *et al.*, 2005), como o tratamento com antimicrobianos, longo tempo entre coleta e processamento das amostras no laboratório e congelamento das amostras pré-isolamento. Outra técnica, aplicada em fragmentos de tecido fixados em formalina tamponada, é a marcação de células bacterianas através da impregnação pela prata, que é inespecífica, ou a utilização de sondas espécie-específicas sinalizadas por um fluoróforo (BOYE *et al.*, 1998; BURROUGH *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos da *B. hyodysenteriae* sofreu alterações, com uma redução da sensibilidade a boa parte dos antimicrobianos utilizados quando comparado a cepas históricas (PRINGLE *et al.*, 2012; PRÁŠEK *et al.*, 2014; KULATHUNGA & RUBIN, 2017; MASSACCI *et al.*, 2018). Parte dessa redução de sensibilidade pode ser justificada pelos genes de resistência encontrados na espécie, e uma justificativa para o desenvolvimento desses genes é a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento (AGP) (MUURINEN *et al.*, 2021).

Resistência a antimicrobianos

O uso de antimicrobianos na produção animal remonta do descobrimento e início da comercialização destes princípios (PAGE, 2006). Inicialmente, a principal função desses antimicrobianos era terapêutica, visando tratar afecções clínicas. Contudo, pouco após o relato de STOKSTAD & JUKES (1950), iniciou-se o uso de antimicrobianos como AGP, a principal forma de utilização atualmente (MCEWEN & COLLIGNON, 2018). Outras utilizações são a profilática, onde doses terapêuticas são aplicadas de forma a prevenir o surgimento de doenças infecciosas de risco, e a metafilática, onde um grupo de animais é tratado devido ao diagnóstico ou detecção de alguma doença infecciosa em um ou mais animais do lote, visando reduzir a disseminação daquela afecção (BARTON, 2000).

Uma definição para resistência a antimicrobianos é a capacidade de um microrganismo de sobreviver aos efeitos de uma concentração normalmente eficaz daquele princípio ativo (BOERLIN & WHITE, 2013), ou na qual o princípio ativo não consegue atingir uma concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, utilizando-se a dose recomendada (SCHWARZ, *et al.*,

2017). Ela pode ser dividida entre intrínseca, onde alguma característica inata daquele microrganismo o torna resistente à base antimicrobiana aplicada (como por exemplo, *Mycoplasma*, que não possuem parede celular, são naturalmente resistentes à antimicrobianos que inibem a síntese de parede celular) (SCHWARZ et al., 2017; NADEEM et al., 2020), ou adquirida.

A resistência a antimicrobianos (AMR) adquirida está relacionada a cepas bacterianas que sofreram mutações genéticas ou adquiriram material genético exógeno que, por certos mecanismos, podem reduzir a efetividade do antimicrobiano em questão (NADEEM et al., 2020), explicados a seguir.

O primeiro mecanismo é a inativação e modificação enzimática. Ocorre através de enzimas específicas desenvolvidas pelo microrganismo para metabolizar o princípio ativo, inserindo grupos fosfato, acetil ou adenil em sítios específicos da molécula, alterando assim sua capacidade antimicrobiana. De forma similar, a inativação ocorre por enzimas produzidas pela bactéria que clivam o princípio ativo em formas sem efeito antimicrobiano, como por exemplo β -lactamases, capazes de clivar antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; SCHWARZ et al., 2017).

O segundo mecanismo é a redução da acumulação intracitoplasmática. Existem dois mecanismos associados: redução de influxo ou aumento de efluxo. A redução do influxo de antimicrobianos geralmente está associada a alterações funcionais, estruturais ou mesmo deleção de genes dos canais usados pelo princípio ativo presentes na parede celular, enquanto o aumento do efluxo antimicrobiano está relacionado a bombas inespecíficas de efluxo (família RND) ou transportadores específicos (Superfamília MFS, família ABC e família MATE) (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; SCHWARZ et al., 2017).

Por fim, a modificação do alvo celular, representa o mecanismo mais variado entre eles. Pode envolver desde mutações no alvo, substituições por alvos não essenciais, até superprodução do mesmo alvo. Em todos os casos, o antimicrobiano perde sua função por não conseguir se ligar de forma eficaz e em concentração necessária para eliminar o microrganismo (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; SCHWARZ et al., 2017).

Compostos alternativos a antimicrobianos

Com o aumento dos relatos de AMR nos últimos anos, o número de pesquisas acerca de alternativas aos antimicrobianos aumentou vertiginosamente (Figura 1). A necessidade do desenvolvimento desses produtos na produção animal se dá pelas políticas de restrição, já discutidas, e a busca por alternativas que aumentem a produtividade e não desenvolvam AMR.

Contudo, a falta de conhecimentos acerca dos mecanismos envolvidos tanto para os AGP quanto para os eventuais substitutos (SAAD et al., 2013; HALLORAN & UNDERWOOD, 2019; LOW et al., 2021). Um dos mecanismos propostos para ambas as tecnologias (AGP e compostos alternativos) é a modulação de microbioma intestinal, contudo, o conhecimento acerca dos impactos das alterações de microbioma na saúde geral ou mesmo na produtividade são, na melhor hipótese, escassos.

Óleos essenciais apresentam-se como compostos alternativos aos antimicrobianos e compõem uma categoria de nutracêuticos conhecida como compostos fitogênicos, também chamados fitonutrientes ou fitobióticos (BALLOU et al., 2019). São, em sua maioria, compostos fenólicos extraídos de diversas partes de plantas (folhas, frutos, sementes, casca, raiz, etc.) que apresentam potencial melhorador de desempenho quando adicionado a alimentação animal (WINDISCH et al., 2008). Existem milhares de óleos essenciais descritos, com características químicas variada, incluindo terpenos, fenilpropenos e terpenoides, produzidos de forma secundária como moléculas de comunicação e defesa das plantas (BRENE; & ROURA, 2010; OMONIJO et al., 2018; STEVANOVIĆ et al., 2018). Óleos essenciais podem variar grandemente dependendo de qual parte da planta e método de extração foram empenhados para a obtenção desse produto (OMONIJO et al., 2018). Existem inúmeros estudos avaliando a eficácia de óleos essenciais, contudo, as metodologias, doses, formulações, métodos de extração e combinações entre diferentes óleos são extremamente variáveis, tornando a comparação de resultados praticamente impossível.

Dadas suas características lipofílicas, os mecanismos de ação propostos para os óleos essenciais são baseados na passagem pela parede celular e membrana citoplasmática, causando perturbações na fisiologia dessas membranas, dentre elas a desestabilização da sua arquitetura, aumentando sua permeabilidade e, conseqüentemente, alterando a produção de energia, transporte transmembrana de íons e outras substâncias (SWAMY et al., 2016). O carvacrol, por exemplo, parece agir como transportador de íons transmembrana, difundindo-se pela membrana citoplasmática e liberando íons H^+ no citoplasma, onde então captura outro íon (como K^+) e é novamente transportado para o meio extracelular, momento no qual realiza uma nova troca de íons (K^+ por H^+) e repete o ciclo (ULTEE et al., 2002, 1999). Outro mecanismo, proposto para o óleo essencial de *Malaleuca alternifolia* envolve a indução da liberação de enzimas autolíticas pelo *Staphylococcus aureus*, com outra hipótese sugerindo alterações na pressão osmótica (SAAD et al., 2013).

Óleos essenciais podem ainda apresentar atividade anti-inflamatória, com diferentes mecanismos propostos para diferentes óleos essenciais. Um exemplo é a redução da expressão

de IL-8, uma importante citocina pró-inflamatória pelo terpinen-4-ol, enquanto o eugenol inibe a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10, além de inibir a ação inflamatória do LPS (SAAD *et al.*, 2013). Um mecanismo molecular proposto para a redução dessas citocinas é a supressão da via do fator nuclear κ B (NF- κ B) (SAAD *et al.*, 2013).

FRANZ *et al.* (2010) avaliaram o consumo voluntário de ração suplementada com óleos essenciais, encontrando resultados variando de -9 a 12%, não sendo possível associar o aumento do consumo unicamente com a suplementação, já que o próprio crescimento animal pode gerar o aumento no consumo. Parece haver influência da suplementação com óleos essenciais na digestibilidade e motilidade do trato gastrointestinal, com aumento na digestibilidade atribuído à maior secreção enzimática e biliar (ZHAI *et al.*, 2018). Existem, ainda, estudos avaliando a atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais e seu impacto na microbiota intestinal, como moduladores, e mesmo avaliando a capacidade de inibição do crescimento de alguns patógenos (AMBROSIO *et al.*, 2020; HULÁNKOVÁ & BOŘILOVÁ, 2011; VANDE MAELE *et al.*, 2016; WALIA *et al.*, 2017), e conseqüentemente sua modulação imunológica, principalmente no âmbito intestinal, dada profunda relação entre microbiota intestinal e sistema imune de mucosa.

Conforme dito anteriormente, mesmo quando aplicados os óleos essenciais mais comumente testados (timol, carvacrol, eugenol e cinamaldeído), diferenças metodológicas impedem a comparação prática entre resultados (FRANZ *et al.*, 2010; STEVANOVIĆ *et al.*, 2018). Entretanto, outra ação associada aos óleos essenciais é a sua capacidade antioxidante, principalmente na forma de seus fenóis, mas também associada a outras frações fitoquímicas (FRANZ *et al.*, 2010; WINDISCH *et al.*, 2008). Essa característica pode ser explorada tanto na alimentação animal, onde a suplementação pode tanto auxiliar na prevenção da oxidação de gorduras da dieta quanto gerar melhores perfis séricos de enzimas e ácidos graxos poli-insaturados (FRANZ *et al.*, 2010; OMONIJO *et al.*, 2018), alterando assim a composição do tecido adiposo desses animais, quanto na preservação de produtos cárneos, prolongando sua vida útil e impedindo alterações qualitativas destes produtos (ZHAI *et al.*, 2018).

Ácidos orgânicos são comumente utilizados na produção de suínos como acidificantes para animais pós-desmama como forma de melhorar a digestibilidade do novo alimento, antes a base de leite materno, mudando radicalmente para uma dieta praticamente exclusiva em grãos (SUIRYANRAYNA & RAMANA, 2015). Entretanto, o principal foco das pesquisas dos ácidos orgânicos nos últimos anos foi no âmbito de promotor de crescimento e antimicrobiano (SUIRYANRAYNA & RAMANA, 2015).

Os ácidos orgânicos podem ser definidos como compostos orgânicos de baixa acidez e pouca dissociação em meios aquosos (PANDA *et al.*, 2016), englobando basicamente três categorias: ácidos graxos de cadeia curta, média e ácido tricarbóxico (TUGNOLI *et al.*, 2020). Ácidos graxos de cadeia curta são ácidos carbóxicos de até cinco átomos de carbono, com os ácidos acético, propiônico e butírico como principais representantes. A suplementação com ácidos graxos de cadeia curta melhorou parâmetros intestinais em leitões como altura de vilosidade, redução de apoptose de enterócitos e aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (DIAO *et al.*, 2019).

Ácidos graxos de cadeia média ocorrem naturalmente em óleos e gorduras vegetais, principalmente palma e coco (ZENTEK *et al.*, 2011), sendo majoritariamente absorvidos por difusão passiva e transportados através da albumina (ZENTEK *et al.*, 2011). Já foram descritas ações antimicrobianas (DECUYPERE & DIERICK, 2003) e melhorias em parâmetros morfofisiológicos intestinais como altura de vilosidades e menor infiltrado linfocítico em lâmina própria (DECUYPERE & DIERICK, 2003).

O ácido benzoico é um dos ácidos orgânicos mais simples, com relatos de atividade antimicrobiana, antioxidante e regulatória de funções intestinais (CHERRINGTON *et al.*, 1991; MAO *et al.*, 2019). A sua associação com ácido butírico (butirato) gerou um aumento no consumo e ganho de peso quando administrado na dieta de leitões entre 7 e 21 dias, bem como na digestibilidade aparente. Os efeitos do ácido benzoico sobre a microbiota foram avaliados em alguns estudos, com alterações significativas na diversidade da microbiota intestinal, contudo, pouco compreendidas acerca da importância dessas alterações na saúde intestinal (DIEBOLD & EIDELSBURGER, 2006; MAO *et al.*, 2019; SUIRYANRAYNA & RAMANA, 2015; TUGNOLI *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2021)

Ao considerarmos os nutracêuticos como eventuais substitutos para antimicrobianos, expandimos exponencialmente o número de compostos com potencial antimicrobiano e, adicionalmente, dificultado, ao menos parcialmente, o desenvolvimento de resistências. Nesse contexto, é importante salientar que essas tecnologias exigem testes para determinar sua real eficácia frente aos microrganismos desejados e seus níveis de segurança. Alternativas não baseadas em antimicrobianas já foram testadas e demonstraram eficácia no controle de doenças em rebanhos suínos, contudo, geram a seleção de microrganismos resistentes em um processo de co-seleção (CIESINSKI *et al.*, 2018).

Capítulo 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais

1. Introdução

Nos últimos anos, o número de microrganismos resistentes e multirresistentes à antimicrobianos tem aumentado, se tornando alvo de investigações ao redor do mundo, sendo um tópico de grande interesse para a Organização Mundial da Saúde (OMS) (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2023; WORLD HEALTH ORGANIZATION WESTERN PACIFIC REGION, 2023). Um dos primeiros relatos acerca da resistência à antimicrobianos (AMR) foi feito pelo próprio descobridor da penicilina, que poucos anos após a descoberta, começou a notar microrganismos, antes sensíveis, se tornarem mais resistentes ao princípio ativo descoberto (FLEMING, 1945). No final da década de 60, um comitê europeu foi formado para avaliar os riscos da utilização de antimicrobianos na produção animal (SWANN *et al.*, 1969), que culminou na adoção de políticas de restrição ao uso de antimicrobianos na forma de promotores de crescimento em toda a Europa quase quatro décadas depois (THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003), política posteriormente adotada pelos Estados Unidos (USA FDA, 2015).

A associação entre o uso de antimicrobianos na produção animal e o aumento da AMR é conhecida e discutida há alguns anos (SIMONSEN *et al.*, 1998; VAN DEN BOGAARD & STOBBERINGH, 1999; ABUOUN *et al.*, 2021), principalmente quando a administração é feita na forma de promotores de crescimento. A administração dessas drogas nesse formato também pode ser chamada de uso subterapêutico de antimicrobianos (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001), que difere das formas de prevenção e tratamento de afecções em animais. O uso terapêutico de antimicrobianos envolve a administração de uma base, nas doses recomendadas, visando combater ou controlar uma infecção ativa, enquanto o uso metafilático ou preventivo envolve a administração de uma base antimicrobiana em um grupo de animais de um mesmo lote ou grupo no qual um ou mais indivíduos apresentam sintomatologia clínica (SCHWARZ *et al.*, 2001).

A carne suína é a segunda mais produzida e consumida do mundo, sendo produzidos mais de 120 milhões de toneladas com um consumo per capita de aproximadamente 14kg/ano (FDA-UN, 2023). Ao mesmo tempo, a produção suinícola é responsável pelo maior consumo de antimicrobianos (VAN BOECKEL *et al.*, 2015) dentre as espécies domésticas, o que torna imperativo o desenvolvimento de políticas e tecnologias que permitam a redução do seu uso subterapêutico na espécie sem que haja impactos na produtividade. Um estudo observando as repercussões da retirada de promotores de crescimento de granjas suínas na Dinamarca revelou que os impactos na produtividade ocorreram principalmente em leitões desmamados, mas que não afetaram o crescimento da produtividade dinamarquesa no período avaliado (WHO, 2003).

Contudo, os mesmos autores sugerem que outras medidas foram tomadas para reduzir os impactos, principalmente melhorias de biossegurança e o uso de compostos alternativos aos antimicrobianos.

Dentre as alternativas ao uso de promotores de crescimento antimicrobianos (AGP), os nutracêuticos têm sido amplamente pesquisados. Abrangendo uma ampla, e crescente, gama de princípios, os nutracêuticos podem ser definidos como alimentos funcionais que auxiliem no tratamento e/ou prevenção de doenças e/ou desordens (KALRA, 2003). Atualmente, óleos essenciais, ácidos orgânicos, prebiótico, probióticos e enzimas compõem os principais nutracêuticos utilizados na produção animal (BALLOU *et al.*, 2019), com diferentes objetivos e modos de ação. Ácidos orgânicos são definidos como compostos orgânicos de baixa acidez que não se dissociam completamente quando solubilizados em água (PANDA *et al.*, 2016), podendo ser administrados via água ou ração, ou ainda ser encapsulados para reduzir a volatilidade e permitir diferentes sítios e períodos de liberação do princípio ativo. O ácido benzoico é um ácido orgânico levemente solúvel em água, composto por um anel de benzeno e um grupo carboxílico que apresenta capacidade de inibição do crescimento de alguns microrganismos patogênicos, sendo utilizado como conservante de alimentos (MAO *et al.*, 2019).

Um importante patógeno entérico na produção suína é a *B. hyodysenteriae*, um dos agentes da Disenteria Suína (DS), que leva a um quadro de diarreia mucohemorrágica severo, acometendo principalmente animais em fase de terminação (HAMPSON & BURROUGH, 2019). A *B. hyodysenteriae* é uma espiroqueta Gram-negativa, anaeróbica e móvel, com um genoma circular bem conservado entre cepas (BELLGARD *et al.*, 2009; BLACK *et al.*, 2015) e poucos genes de resistência a antimicrobianos já identificados (PRINGLE *et al.*, 2004; CARD *et al.*, 2018; LUCA *et al.*, 2018).

Não existem estudos avaliando o impacto econômico da DS em rebanhos suínos, enquanto estudos acerca da prevalência são raros e, geralmente, subestimados devido aos métodos diagnósticos disponíveis (BARCELLOS *et al.*, 2000; CARVAJAL *et al.*, 2006; BIKSI *et al.*, 2007; VIOTT *et al.*, 2013). O controle da DS é baseado no uso de antimicrobianos de forma profilática, sendo os mais utilizados a tiamulina, valnemulina, lincomicina e tilvalosina. Contudo, em diversas regiões do mundo, as avaliações de sensibilidade a antimicrobianos da *B. hyodysenteriae* revelam uma redução dessa sensibilidade (PRINGLE *et al.*, 2007, 2012; DUINHOF *et al.*, 2008; ŠPERLING *et al.*, 2011; DANIEL *et al.*, 2017; MAHU, M. *et al.*, 2017; MASSACCI *et al.*, 2018; YEH *et al.*, 2018; HAMPSON *et al.*, 2019). A falta de metodologias rápidas de determinação de valores de MIC representa um desafio na escolha de antimicrobianos para o tratamento da DS

(HAMPSON et al., 2019), principalmente em momentos de surtos, onde a mortalidade pode aumentar significativamente em animais de terminação.

Pesquisas acerca de compostos alternativos para o tratamento e controle da DS são escassas, sendo a grande maioria avaliações *in vitro* (BERNARDEAU et al., 2009; KUTASI et al., 2016; VANDE MAELE et al., 2016; DE NOVA et al., 2017; DRAŠKOVIĆ et al., 2019). Outro complicador é que essas pesquisas avaliaram compostos diferentes, principalmente óleos essenciais e compostos fitogênicos, tornando complexa a interpretação da eficácia dos nutracêuticos sobre a espécie.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do ácido benzoico grau alimentar bem como sua associação à óleos essenciais sobre a *B. hyodysenteriae* através da técnica de microdiluição em caldo.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos

Para este estudo, nove cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* foram obtidas a partir do isolamento microbiano a partir de fezes de suínos com sintomatologia clínica de DS remetidas à Escola de Veterinária da UFMG para diagnóstico laboratorial. As cepas obtidas no isolamento tiveram a espécie bacteriana confirmada pela técnica de reação em cadeia de polimerase *duplex* para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, a partir da qual foi detectado apenas DNA de *B. hyodysenteriae*. Também foi utilizado uma cepa referência (B204). As cepas foram selecionadas em decorrência do perfil de sensibilidade a antimicrobianos e óleos essenciais avaliados em outro estudo (ARAÚJO, 2020).

As 10 cepas (Tabela 1) foram utilizadas na avaliação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) *in vitro* dos princípios ativos: ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais.

A partir do isolamento inicial, as cepas foram mantidas a -80°C até a realização do presente estudo, quando foram semeadas diretamente em placas de meio seletivo para *Brachyspira* spp. [(ágar triptona de soja (TSA) suplementado com 5% sangue ovino, rinfampicina (6,25 mg/ml), espectinomicina (800 mg/ml), vancomicina (25 mg/ml) e colistina (25 mg/ml) (adaptado de NOVOTNÁ&ŠKARDOVÁ, (2002) e incubados, por três dias, a 37°C, em jarras de anaerobiose. Após este período, as cepas foram semeadas em TSA suplementado com 5% sangue ovino e incubadas, por três dias, a 37°C, em jarras de anaerobiose. Para obtenção de 10⁸ bactérias/ml, as placas foram lavadas com caldo BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino e a concentração foi determinada com escala de McFarland, 0,5.

2.2. Diluição dos princípios ativos

O princípio ativo VevoVital (Ácido benzoico grau alimentar - DSM Produtos Nutricionais Brasil SA) foi diluído em metanol na concentração de 250.000µg/ml e esterilizado por passagem em filtro de poro 0,22 µm e armazenado em congelador (-1 a -4°C) até posterior uso.

Em decorrência da não solubilização completa do produto comercial devido à microencapsulação adotada pelo fabricante, o princípio VevoWin foi preparado a partir do ácido benzoico grau alimentar (223.250 µg), adicionado de 15.210 µg da mistura de óleos essenciais, composto de timol, eugenol e piperina (CRINA – DSM Produtos Nutricionais Brasil SA) e 11.540 µg de sais inertes (solução de PBS – Fosfato de sódio mono e dibásico e cloreto de sódio), totalizando 250.000 µg/ml, esterilizados por passagem em filtro 0,22 µm e armazenados em congelador (-1 a -4°C) até posterior uso.

2.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Para a técnica de MIC, os princípios ativos foram diluídos a 11 diferentes concentrações e adicionados à suspensão de bactérias, com concentrações variando entre 10.000µg/ml a 4.88µg/ml para o VevoVital, e entre 12.000 µg/ml e 11.72 µg/ml para o VevoWin, incluindo controle negativo, sem adição de nenhum composto, e um controle do diluente, onde foi adicionado metanol na mesma proporção que foi adicionado aos poços com os princípios.

3. Resultados

O valor de MIC do crescimento bacteriano foi determinado de acordo com a turbidez nas diferentes concentrações, apresentado na tabela 2, de acordo com ARAÚJO (2020).

Tabela 1. Origem e ano de isolamento dos isolados de *B. hyodysenteriae* utilizados na avaliação *in vitro*

No.	Identificação interna	Origem (Estado Brasileiro)	Ano de isolamento
1	B204	ATCC® 31212	ATCC® 31212
2	365/12	-	2012
3	HK240	São Paulo	2018
4	F28/19 – TP3	Paraná	2019
5	493/13	-	2013
6	GB2	Minas Gerais	2013
7	415/15	Minas Gerais	2012
8	F26/18-1 (6)	São Paulo	2018
9	F28/19-3650w	Paraná	2019
10	CP2	Rio Grande do Sul	2018

Tabela 2. Valores de MIC em µg/ml para cada cepa e princípio ativo, incluindo controle de diluente, pela técnica de microdiluição em caldo

Código	Valores de MIC (em µg/ml)		
	Ác. Benz. Grau alimentar	Ác. Benz. Óleo	Metanol
B204	2.500	3000	>4%
365/12	2.500	3000	>4%
HK240	2.500	3000	>4%
F28/19 – TP3	2.500	3000	>4%
493/13	2.500	3000	>4%
GB2	2.500	3000	>4%
415/15	2.500	3000	>4%
F26/18-1 (6)	2.500	3000	>4%
F28/19-3650w	1.250	1500	>4%
CP2	2.500	3000	>4%

4. Discussão

Existe uma escassez de estudos avaliando a atividade antimicrobiana de compostos alternativos para a *B. hyodysenteriae*. O objetivo do presente estudo foi elucidar os valores de MIC para dez isolados de *B. hyodysenteriae*, levando em consideração as recomendações de níveis de inclusão de cada produto na ração. A técnica de microdiluição em caldo foi recentemente desenvolvida e padronizada (ARAÚJO, 2020), apresentando uma boa capacidade em determinar o valor de MIC para diferentes princípios, sendo, portanto, escolhida como método para avaliação de ambos os produtos. Atualmente existem poucas técnicas de determinação de MIC para microrganismos anaeróbicos como a *B. hyodysenteriae*, sendo elas a diluição em ágar (KULATHUNGA *et al.*, 2023), a macrodiluição em caldo KARLSSON *et al.*, 2002) e a microdiluição em caldo (HERBST *et al.*, 2014; ARAÚJO, 2020).

O método de diluição em ágar se baseia na produção de placas de ágar de cultivo para *B. hyodysenteriae* contendo, em diferentes placas, diferentes concentrações do princípio ativo a ser testado (MESSIER *et al.*, 1990; PRÁŠEK *et al.*, 2014; KULATHUNGA *et al.*, 2023). O preparo e cultivo dessa metodologia é complexo e exige um grande volume de placas, a depender da

quantidade de princípios e isolados a serem testados. O método de macrodiluição em caldo proposto por KARLSSON *et al* (2002) foi um dos mais utilizados (PRINGLE *et al.*, 2012; DANIEL *et al.*, 2017; VEGA *et al.*, 2022), principalmente devido à disponibilização de uma placa comercial já contendo os princípios ativos (VetMIC Brachy – SVA – National Veterinary Institute, Uppsala, Suécia), onde era necessário adicionar a cada poço um volume adequado de uma suspensão da bactéria em caldo BHI. Contudo, por já conter os princípios liofilizados, não seria possível avaliar outros produtos, e por se tratar de uma placa com 48 poços, o número de diluições e princípios se torna um pouco mais limitado. O princípio da técnica de microdiluição é similar ao proposto por KARLSSON *et al* (2002), contudo, cada princípio ativo pode ser adicionado separadamente a uma placa de 96 poços, o que permite a avaliação de quaisquer produtos solúveis, em qualquer concentração desejada.

A recomendação de inclusão do ácido benzoico grau alimentar na alimentação de suínos é de 5kg/t, enquanto a sua forma associada à óleos essenciais tem uma inclusão recomendada de 3kg/t (DSM Produtos Nutricionais Brasil SA). Um único estudo realizou a avaliação da efetividade do ácido benzoico sobre a *B. hyodysenteriae*, indicando um MIC de aproximadamente 5000µg/ml, valor compreendido no nível de inclusão indicado (VANDE MAELE *et al.*, 2016). Para evitar que qualquer isolado apresentasse MIC superior ao indicado por VANDE MAELE *et al* (2016), um log acima foi escolhido como inicial. Nossos resultados apontam uma sensibilidade similar para o ácido benzoico grau alimentar (2500µg/ml) em relação aos isolados belgas, incluindo as cepas de referência utilizadas (B204 – ATCC® 31212™ no presente estudo e B78 – ATCC® 27164™ no estudo belga), apenas um isolado (F28/19 – 3650w) apresentando um MIC de 1250µg/ml. O perfil de sensibilidade a antimicrobianos desse isolado é similar aos demais (ARAÚJO, 2020), e ainda está dentro da faixa de variação (um log abaixo ou acima) considerada aceitável para testes de diluição em caldo (KARLSSON *et al.*, 2002).

Em contrapartida, não existem resultados de MIC da associação entre o ácido benzoico e óleos essenciais para a *B. hyodysenteriae* na literatura. Dessa forma, a concentração inicial para a avaliação dessa associação foi alterada para ampliar o espectro de detecção do teste e chegar à concentração sugerida de 3000µg/ml em diluições subsequentes. Os resultados indicam um valor de MIC exatamente igual ao sugerido para a inclusão, novamente com apenas uma cepa (F28/19 – 3650w) apresentando um log a menos como resultado. VANDE MAELE *et al* (2016) encontraram que a associação entre óleos essenciais e ácidos orgânicos apresentaram apenas efeitos aditivos, enquanto os valores obtidos na avaliação do ácido benzoico grau alimentar e associado no presente estudo são próximos, sugerindo que não houve efeitos sinérgicos ou aditivos entre ácido benzoico e óleos essenciais nas concentrações avaliadas.

Relatos acerca da utilização de ácidos orgânicos como substitutos aos antimicrobianos remontam da década de 60 (HENIS *et al.*, 1964), e seus mecanismos antimicrobianos não são completamente reconhecidos, sendo descritos mecanismos envolvendo a difusão da sua forma não dissociada pela parede celular bacteriana seguida pela sua dissociação no citoplasma bacteriano (MROZ, 2005), aonde acarretaria em alterações de pH citoplasmático e ativação de mecanismos de compensação para ajuste do pH pela bactéria, consequentemente aumentando a demanda energética e reduzindo a disponibilidade de energia para a replicação.

Numa avaliação para a sensibilidade antimicrobiana de ácidos orgânicos e óleos essenciais para diversas cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Clostridium perfringens*, GÓMEZ-GARCÍA *et al.* (2019) encontraram pouca variação de resultados para cepas e cada ácido orgânico, contudo grandes diferenças entre cada espécie, ilustrando uma impossibilidade de transpor resultados de uma espécie para outra, mesmo que com características similares. Entretanto, outro estudo (BONETTI *et al.*, 2020) avaliou a atividade inibitória do ácido benzoico sobre a *E. coli*, encontrando resultados similares aos encontrados em nosso trabalho.

Em suínos, um dos primeiros relatos encontrados avaliou a eficácia do uso dos ácidos láctico e cítrico no controle da doença do edema (TSILOYIANNIS *et al.*, 2001b) e ácidos propiônico, láctico, fórmico, málico, cítrico e fumárico no controle da diarreia pós-desmama (TSILOYIANNIS *et al.*, 2001^a), demonstrando efetividade destes compostos na inibição do crescimento de cepas de *E. coli* testadas. Outros estudos apontam que a suplementação da dieta de leitões entre 40 e 50 dias de vida com ácidos orgânicos reduz a excreção de *Salmonella* e/ou melhoram os índices zootécnicos (CALVEYRA *et al.*, 2012; LYNCH *et al.*, 2017; RUGGERI *et al.*, 2018).

A suinocultura é um braço importante da economia mundial, sendo a segunda carne mais consumida no mundo. Estratégias para que a sua produção se dê de forma sustentável e alinhada com os conceitos de Saúde Única, como a preocupação com o desenvolvimento de microrganismos resistentes à antimicrobianos, são fundamentais para assegurar que a produtividade e saúde humana e animal caminhem juntas, gerando os menores impactos possíveis na sociedade. Como um dos maiores consumidores de antimicrobianos na produção animal, a produção de suínos deve se atentar aos pormenores para atingir esses objetivos, utilizando-se de tecnologia e medidas de biossegurança para reduzir o uso desnecessário de antimicrobianos e, consequentemente, auxiliando na redução do desenvolvimento da resistência.

Estudos avaliando alternativas aos antimicrobianos apresentaram um aumento considerável nos últimos anos, alavancados principalmente pela pressão de políticas públicas voltadas à

restrição ao uso indiscriminado desses produtos. Inúmeras alternativas são plausíveis de aplicação na produção suinícola, contudo, o respaldo na ciência é fundamental, levando em consideração a imensa gama de possíveis candidatos. Outra importante faceta deste problema é que, até o presente momento, não existe um substituto perfeito, que controlará todas as afecções no sistema produtivo, sendo de baixo custo e fácil aplicação. Dentre as principais medidas a serem tomadas, o aumento ou melhoria de medidas de biossegurança é, seguramente, a melhor opção, impedindo a entrada de patógenos e microrganismos prejudiciais à produção no sistema produtivo, ficando o uso de alternativas como ferramenta secundária para o combate de falhas na biossegurança ou controle de doenças já estabelecidas de difícil erradicação.

O real impacto da Disenteria Suína na produção não é completamente conhecido nem mensurado. As estratégias de controle ainda são completamente baseadas no uso de antimicrobianos tanto profilático quanto terapêutico e metafilático, podendo estar associadas ao aumento da resistência a antimicrobianos observada nos últimos anos para a espécie. Pesquisas avaliando compostos alternativos para o controle e tratamento da DS são extremamente escassas, revelando a necessidade do desenvolvimento de linhas de pesquisa voltadas para a espécie.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar a capacidade inibitória do ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais sobre a *B. hyodysenteriae in vitro*. Apesar de ser um estudo *in vitro*, a capacidade inibitória encontrada nos nossos resultados encoraja futuros prospectos de outros produtos, bem como a evolução desse estudo para um modelo *in vivo*, que será explorado no capítulo 2.

Capítulo 2 – Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* do ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais em um desafio experimental com *B. hyodysenteriae*

1. Introdução

Existem, atualmente, nove espécies descritas no gênero *Brachyspira*, das quais sete já foram detectadas em suínos. Dentre as espécies patogênicas para suínos, a de maior destaque é a *Brachyspira hyodysenteriae*, principal causadora da Disenteria Suína (DS) (HAMPSON & BURROUGH, 2019), importante causa de perdas econômicas na suinocultura mundial principalmente em animais de recria e terminação (BURROUGH, 2017). Outra espécie associada à DS é a *B. hamptonii*, contudo, não existem relatos da sua detecção no Brasil. A *B. pilosicoli*, por sua vez, é relacionada a uma doença menos severa, conhecida como espiroquetose intestinal suína (HAMPSON & BURROUGH, 2019). Alguns relatos identificam uma terceira espécie, a *B. suanatina*, como agente etiológico da DS em países europeus (RÅSBÄCK et al., 2007; CYBULSKI et al., 2023).

Os aspectos metabólicos da *B. hyodysenteriae* são pouco conhecidos, com estudos demonstrando duas vias de geração de energia a partir da glicose, uma gerando butirato e outra acetato, que utilizam NADH como parte de seu metabolismo (STANTON, 1997). A fonte de lipídeos (colesterol) também é uma fonte importante para o crescimento bacteriano *in vitro* (STANTON & CORNELL, 1987), sendo sugerido que parte da lesão intestinal causada pode estar relacionada ao uso dos lipídeos da membrana citoplasmática das células eucariotas intestinais. O metabolismo do NADH também está relacionado ao consumo de O₂ e produção de H₂, importante na manutenção da anaerobiose (STANTON, 1989).

Todos os organismos aeróbicos exigem oxigênio molecular como receptor de elétrons para a produção de energia, com a desvantagem de gerar radicais livres, dentre eles as espécies reativas de oxigênio (ROS) (SORDILLO & AITKEN, 2009). O acúmulo de ROS pode gerar lesões em membranas lipídicas, proteínas e material genético. Contudo, níveis basais de ROS são necessários para o funcionamento celular normal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015; LIN et al., 2022). Para mitigar o acúmulo de radicais livres, os sistemas orgânicos desenvolveram substâncias para atrasar, prevenir ou reverter os danos causados às moléculas, chamadas antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas (LIN et al., 2022).

Dentre as moléculas antioxidantes, uma das mais bem estudadas é a catalase (CAT), responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e Oxigênio (O₂), estando presente na maioria dos tecidos que utilizam oxigênio (MAHOMOODALLY et al., 2022). O sistema glutationa (GSH) é um conjunto de enzimas que protegem organelas, principalmente mitocôndrias, e auxiliam a CAT na redução do H₂O₂ e peróxidos de ácidos graxos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015). A glutationa S-transferase (GST) é uma enzima do sistema glutationa associada ao metabolismo de xenobióticos (compostos exógenos) como toxinas e drogas,

conjugando o composto à GSH (HALLIWELL & GUTTERIDHE, 2015). Outra grande família de enzimas, detectada em diversos órgãos, é a superóxido desmutase (SOD), cuja principal função é a desmutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDHE, 2015). Os peróxidos lipídicos (LPO) são formados a partir da degradação de ácidos graxos poliinsaturados que foram atacados por peróxidos e íons metálicos, principalmente ferro (Fe) (GASCHLER & STOCKWELL, 2017). O óxido nítrico (NO) participa de diversas funções intestinais, dentre elas a manutenção da integridade da mucosa (LANAS, 2008), sendo produzido a partir da oxidação da L-arginina em L-citrulina pelo óxido nítrico sintase (NOS).

O uso de antimicrobianos permanece como uma das poucas ferramentas na prevenção e controle da DS (HAMPSON & BURROUGH, 2019), já que não existem vacinas comerciais eficazes disponíveis (NEIRYNCK *et al.*, 2018). Em decorrência disso, a sensibilidade a antimicrobianos da *B. hyodysenteriae* vem reduzindo, com alguns genes específicos sendo identificados nos últimos anos (MAHU *et al.*, 2017; CARD *et al.*, 2018; HAMPSON *et al.*, 2019)

Lideradas pela União Europeia e Estados Unidos, políticas públicas de restrição ao uso indiscriminado de antimicrobianos vêm sendo implementadas (BRASIL, 2016ab, 2020) no Brasil, com uma tendência a serem adotadas em todos os países exportadores de produtos de origem animal de forma a atender as exigências dos países importadores principalmente europeus (THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003, 2018). A partir dessas políticas, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento ou mesmo na forma profilática será banido ou estritamente controlado. A principal justificativa para a adoção de tais medidas é justamente o aumento da resistência a antimicrobianos (AMR), que só no ano de 2019 teve mais de 1,5 milhão de mortes associadas à resistência, avaliando exclusivamente infecções do trato respiratório inferior (MURRAY *et al.*, 2022).

Uma das justificativas para o aumento da AMR é a sua utilização na produção animal, que no ano de 2010 consumiu cerca de 63 mil toneladas, com o maior nível de consumo atribuído a suínos (VAN BOECKEL *et al.*, 2015). A prerrogativa da preocupação do aumento de AMR em animais se dá pela possibilidade de transmissão de genes de resistência, desenvolvidos em microrganismos em animais, para microrganismos potencialmente patogênicos para humanos, mesmo que apenas um estudo tenha sido encontrado demonstrando similaridade genética entre amostras humanas e animais resistentes à meticilina, com uma correlação espaço-temporal que pudesse justificar a transmissão animal-humana (HOWER *et al.*, 2013) .

Alternativas ao uso de antimicrobianos são pesquisadas há anos, contudo, o número de trabalhos publicados acerca do tema aumentou consideravelmente nos últimos anos. Só nos

últimos três anos (2021, 2022 e 2023), a média de publicações foi aproximadamente 1,6 vezes maior quando comparado à década anterior (2011 a 2020), avaliando o banco de dados disponível no PubMed (BURROUGH, 2017; HAMPSON, & BURROUGH, 2019).

Uma das alternativas são os ácidos orgânicos, entre eles o ácido benzoico, e os óleos essenciais. O ácido benzoico é um dos mais simples ácidos orgânicos, cujas propriedades promotoras de crescimento em leitões são sugeridas em diversos artigos (KLUGE et al., 2006; MAO et al., 2019; ZHAI et al., 2020; WANG, FANG et al., 2021). Óleos essenciais são compostos bioativos extraído de plantas (OMONIJO *et al.*, 2018) que podem ter ações modulatórias e antimicrobianas no trato gastrointestinal (HAMMER et al., 1999; WINDISCH et al., 2008; DIAO et al., 2014; FRATINI et al., 2020).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da suplementação com ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais frente a um desafio experimental de *B. hyodysenteriae* em leitões susceptíveis, avaliando eficácia na redução de sinais clínicos de diarreia, lesões macro e microscópicas e excreção fecal, bem como observar os efeitos do desafio em parâmetro de estresse oxidativo na mucosa intestinal com e sem a suplementação com os princípios.

2. Material e métodos

2.1. Animais e delineamento experimental

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 210/2021) da UFMG. Foram utilizados 40 leitões de 21 dias de idade, provenientes de uma granja comercial, sem histórico clínico de diarreia e testados negativos para *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis* e *Salmonella* sp. Os animais foram separados em quatro grupos, sendo esses: grupo controle negativo (NC) com animais que não foram suplementados com nutracêuticos e nem inoculados com *B. hyodysenteriae* (n = 10); grupo suplementado com ácido benzoico grau alimentar (BA) a partir de 32 dias de idade e inoculados com *B. hyodysenteriae* (n=10); grupo suplementado com ácido benzoico e óleos essenciais (BAEO) a partir de 32 dias de idade e inoculados com *B. hyodysenteriae* (n=10); e grupo controle positivo (PC) não suplementados com nutracêuticos e inoculado com *B. hyodysenteriae* (n=10) (Figura 2).

Os animais foram pesados na chegada às instalações e randomizados de forma a balancear a distribuição de peso em dois blocos (leves, com até 4,5 kg, e pesados, acima de 4,5 kg) entre os tratamentos, sendo então alojados em três salas, aclimatados às instalações por sete dias, recebendo ração comercial pré-inicial e água *ad libitum*. A inoculação dos animais dos grupos BA, BAEO e PC ocorreu aos 50 dias de idade, em três dias consecutivos, dias 0, 1 e 2. Amostras de fezes foram coletadas aos 32, 50, 53, 56, 59, 62 e 64 dias de idade (dias -18, 0, 3, 6, 9, 12 e 14

em relação ao primeiro dia da inoculação), e testadas por qPCR para *B. hyodysenteriae* (RUBIN et al., 2013). Os animais foram eutanasiados 14 dias pós-inoculação (dpi) de acordo aos critérios estabelecidos CEUA e necropsiados. Durante o experimento não foi empregado nenhum tipo de antimicrobiano ou composto que pudesse interferir no resultado do estudo. As atividades foram executadas de acordo com protocolos de biossegurança pré-estabelecidos, por uma equipe treinada dividida em três grupos distintos, cada uma responsável por um dos grupos experimentais de modo a minimizar a chance de contaminação cruzada entre os grupos experimentais.

2.2. Dieta

Todos os animais receberam ração balanceada *ad libitum*, a base de milho e soja, atendendo as demandas metabólicas durante todo o período experimental (Tabela 3). Durante o período de aclimatação os animais receberam ração suplementada com antimicrobianos e óxido de zinco, conforme a realidade da granja de origem, buscando-se reduzir eventuais afecções entéricas por consequência do stress. Após o período de aclimatação, os animais foram introduzidos à nova dieta de forma progressiva durante três dias, com substituição progressiva da ração suplementada com antimicrobiano pela ração experimental. Assim, os leitões do grupo BA receberam ração suplementada com VevoVital na proporção de 5 kg por tonelada de ração, a partir de 18 dias antes da inoculação, até o fim do experimento, enquanto os animais do grupo BAEO receberam ração suplementada com VevoWin na proporção de 3 kg por tonelada pelo mesmo período. Os animais dos grupos PC e NC receberam ração livre de qualquer aditivo durante todo período pós adaptação.

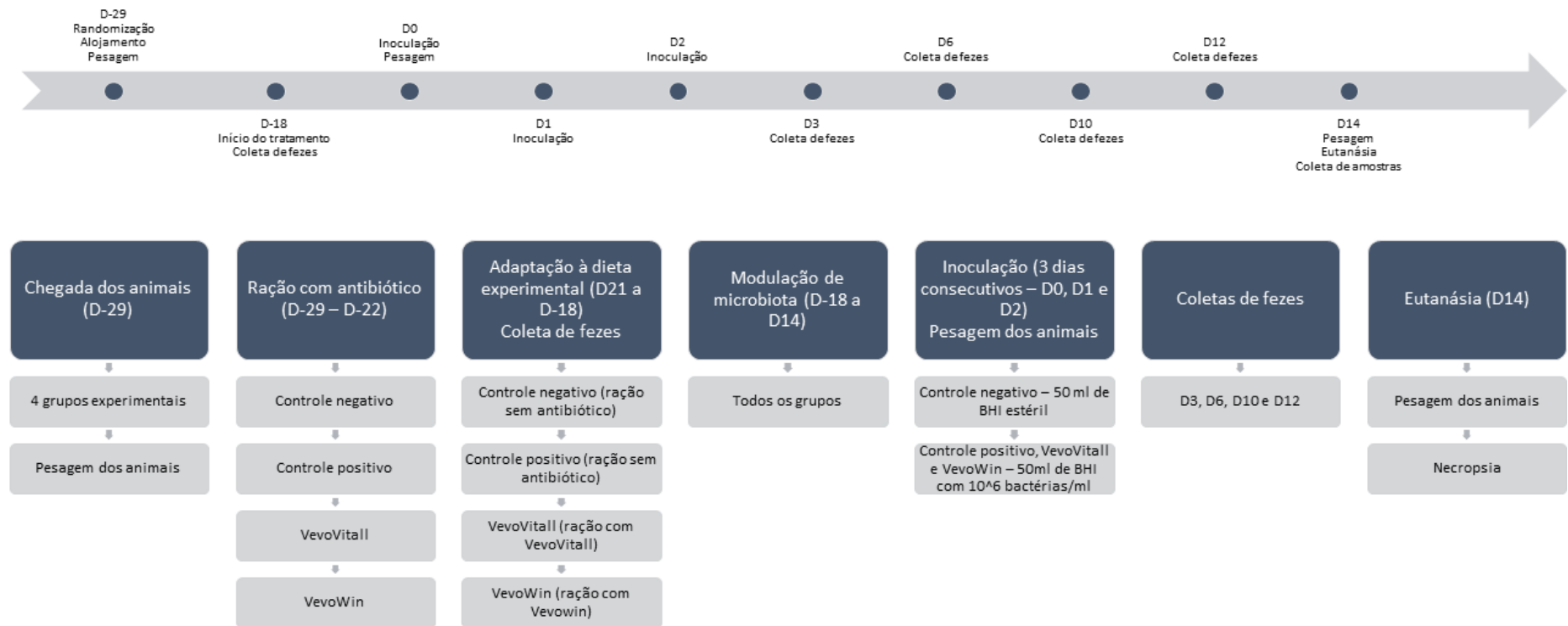


Figura 2. Delineamento experimental in vivo

Tabela 3. Composição percentual da ração para os grupos experimentais utilizada a partir do período de aclimação até a finalização do experimento (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Ingrediente</i>	<i>BA (5kg/ton)</i>	<i>BAEO (3kg/ton)</i>	<i>Controle (PC e NC)</i>
<i>Milho</i>	58,304%	58,304%	58,304%
<i>Soja</i>	30,158%	30,158%	30,158%
<i>Açúcar</i>	3,973%	3,973%	3,973%
<i>Óleo degomado</i>	2,780%	2,780%	2,780%
<i>Fosfato bicálcico</i>	1,573%	1,573%	1,573%
<i>Sal</i>	0,496%	0,496%	0,496%
<i>DL-Metionina</i>	0,083%	0,083%	0,083%
<i>L-Lisina HCL</i>	0,291%	0,291%	0,291%
<i>L-Treonina</i>	0,288%	0,288%	0,288%
<i>Calcário</i>	1,059%	1,059%	1,059%
<i>Premix</i>	0,496%	0,496%	0,496%
<i>Inerte</i>	0,000	0,200%	0,500%
<i>Produto teste</i>	0,500%	0,300%	0,000%
<i>Total</i>	100.000	100.000	100.000

2.3. Preparo do inóculo e inoculação

A cepa patogênica de *B. hyodysenteriae* utilizada para preparação do inóculo foi obtida em 2013 de um suíno que apresentava quadro clínico de DS grave, proveniente de granja localizada no estado de Minas Gerais (DANIEL *et al.*, 2023). A cepa foi confirmada como *B. hyodysenteriae* através da técnica de PCR *duplex* para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, sendo detectado unicamente DNA associado à *B. hyodysenteriae*. Brevemente, a cepa patogênica de *B. hyodysenteriae* foi semeada em ágar triptona de soja (TSA) suplementado com 5% de sangue ovino sob atmosfera anaeróbica (N₂ 80%, CO₂ 10% e H₂ 10%), à 37°C durante quatro dias. Em seguida, as placas de ágar TSA foram lavadas com caldo BHI estéril enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB). Esse lavado das placas foi incubado em caldo de crescimento BHI enriquecido com 10% de SFB por aproximadamente 21 horas, à 37°C em estufa agitadora (garrafa mãe), e,

posteriormente, 10ml foram retirados da garrafa mãe e inoculados em novas garrafas (garrafa filha) contendo caldo de mesma composição, sendo cultivadas por 16-18 horas, aproximadamente, de acordo com curva de crescimento, que será explicada a seguir (Figura 3). No momento da inoculação, cada garrafa filha foi aberta e o conteúdo distribuído em bquer para homogeneizar a concentração de inóculo para todos os animais. A inoculação dos animais ocorreu a partir do 18º dia após o início do tratamento com as rações experimentais. Os leitões dos grupos BA, BAEO e CP foram inoculados por via intra-gástrica por tubo de alimentação, por três dias subsequentes, com 50 ml do inóculo na concentração média de $1,7 \times 10^9$ bactérias/ml. O grupo NC recebeu 50 ml de caldo BHI estéril também pelo mesmo período e método.

2.4. Curva de crescimento

Para determinar o melhor momento para realizar a inoculação dos leitões, uma curva de crescimento para a cepa de *B. hyodysenteriae* foi realizada. Foi realizada o cultivo de uma placa mãe, conforme explicado anteriormente, por aproximadamente 21 horas, de onde foram retirados 10ml e inoculados em duas garrafas filhas, sendo essa considerada a hora zero de crescimento. A quantidade de bactérias foi avaliada através da contagem em câmara de Neubauer em microscopia de contraste de fase, sendo contados quatro campos e retirada a média do número de bactérias contadas, em cada garrafa. Os pontos de contagem foram as 0, 9, 11, 13, 15, 19, 21 e 23 horas. O objetivo da curva foi encontrar o intervalo onde o crescimento bacteriano era logarítmico, buscando maximizar o sucesso da inoculação.

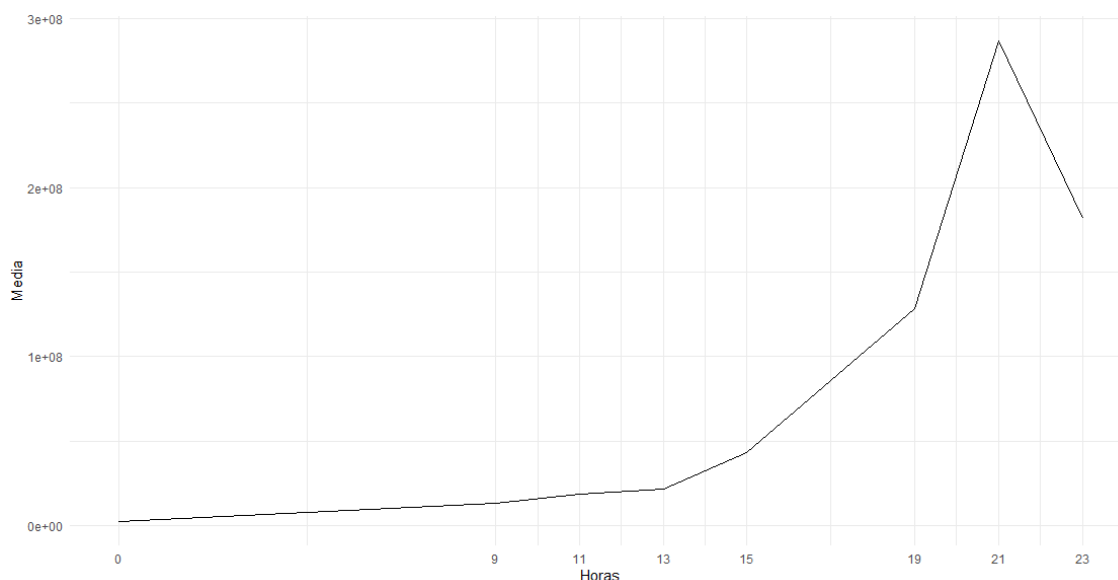


Figura 3. Curva de crescimento da cepa de *B. hyodysenteriae*, utilizada na inoculação, cultivada em caldo BHI + SFB

2.5. Avaliação clínica e ganho de peso

Após a inoculação os animais foram observados e avaliados diariamente quanto a consistência fecal, sendo classificada em escores variando de 0 a 4, onde 0 = normal, 1 = consistência semissólida, 2 = pastosa, 3 = severamente líquido/aquoso e 4 = presença de muco perceptível e/ou sangue.

Os animais foram pesados nos dias -21, 0, e 14 para o cálculo do ganho de peso médio (ADG) total, determinado pela diferença entre o peso final e peso inicial de cada animal dividido pelos dias totais de estudo.

2.6. Avaliação anatomopatológica

Os animais foram eutanasiados 14 após a inoculação, de acordo as normas exigidas pelo CEUA. Em seguida eles foram necropsiados e avaliados quanto as lesões macroscópicas intestinais, a partir da quais foi dado um escore final, definido pela multiplicação entre o grau de lesão e a extensão da lesão. Fragmentos de intestino grosso e linfonodos mesentéricos foram coletados e fixados em formalina tamponada 10% para avaliação microscópica. Além disso, foram coletadas amostras de fezes da ampola retal para análises de qPCR.

2.7. Histologia

Os fragmentos de intestino grosso (ceco e cólon) coletados das áreas de lesão foram desidratados em álcool etílico absoluto, hidratados por xilol e incluído em parafina para confecção de lâminas histológicas, coradas por hematoxilina e eosina (HE) e, posteriormente, avaliados quanto a presença de alterações histopatológicas, compatíveis com infecção por *B. hyodysenteriae*. Nas porções do intestino grosso, as lesões foram avaliadas e classificadas segundo a intensidade (discreta, moderada ou intensa) e distribuição (focal, multifocal, multifocal a coalescente e difusa), com pesos para cada uma das lesões de acordo com o seu impacto em relação ao quadro clínico da doença (3 para hiperplasia de células caliciformes, presença de muco e necrose, 2 para fibrina e hemorragia, 1 para restos necróticos em cripta, inflamação, hiperemia e dilatação de cripta). Posteriormente, foi determinado o escore final por animal através da multiplicação dos parâmetros avaliados, levando em consideração o peso, grau de lesão e distribuição.

qPCR

As amostras de fezes coletadas nos dias -18, 3, 6, 9, 12 e 14 foram para a realização da técnica de PCR quantitativo (qPCR) específico para a *B. hyodysenteriae*. Para isso, foi extraído o DNA total a partir de 200 mg de fezes utilizando o kit comercial QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Toronto, Ontário), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram utilizados os primers JH0073 (5'-AGT GAA ATA GTT GCT CAT ATC AAA -3') e JH0074 (5'-GCA TCA CTG ATT AAA GAA CCA ATT-3') (RUBIN et al., 2013) como alvo o gene Nox, utilizando a curva padrão já preparada em experimentos anteriores utilizando o mesmo protocolo e primers. A reação foi realizada em 25 µl, composta por 1x SYBR Green PCR MasterMix, 1x QN ROX Reference Dye (QuantiNova SYBR Green PCR Kit, Qiagen Inc., Toronto, ON), 500 nm de cada um dos primers e 5 µl de DNA extraído. Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo que em cada reação foram adicionados controle negativo, oriundo de fezes sabidamente negativas e extraídas pelo mesmo protocolo, e controle positivo, oriundo da extração das colônias puras utilizadas na inoculação. Foram aplicadas as seguintes condições de amplificação: 2 min a 50° C, 10 min a 95° C, 40 ciclos de 15 seg a 95° C, e 1 min a 60° C. As reações foram analisadas através do software QuantStudio™ RealTime PCR.

2.8. Atividade antioxidante de enzimas em raspado de mucosa

Foram avaliados seis parâmetros associados à atividade antioxidante (redox) em raspado de mucosa, obtido do ápice do cólon espiral. O raspado foi executado com lâminas de vidro individuais para cada animal, para evitar a contaminação cruzada, com um intervalo máximo entre a eutanásia e coleta do raspado de cinco minutos. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em gelo seco e enviadas a um laboratório externo (Imunova Análises Laboratoriais, Curitiba, PR) para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, descritas a seguir.

A catalase (CAT) atua na degradação de H₂O₂ em H₂O e O₂. O princípio do método se baseia na formação de um complexo catalase- H₂O₂. No comprimento de onda de 240nm, a degradação de H₂O₂ causa uma diminuição contínua na absorbância, demonstrando a atividade da catalase (AEBI, 1984).

A glutatona reduzida (GSH) é uma molécula que está envolvida em vários processos celulares, sendo considerada um componente essencial para a reação redox. Sua determinação se dá através da sua reação com o o-ftaldeído, que reage especificamente com o GSH em pH 8, levando a uma fluorescência mais intensa em relação a outros tióis. A reação é detectada no comprimento de onda de 350/420nm (HISSIN; & HILF, 1976).

As glutatona S-transferases (GSTs) são responsáveis por iniciar a detoxificação de agentes alquilantes, através do grupo -SH da glutatona. O método para detecção da atividade da GST se baseia na formação de um conjugado entre o CDNB e a GST, que é detectado por cinética no comprimento de onda de 340nm (HABIG *et al.*, 1974).

No estresse oxidativo ocorre a formação de peróxidos lipídicos (LPO), que podem ser detectados através de uma reação onde os peróxidos oxidam o Fe^{2+} para Fe^{3+} quando em solução ácida. O Fe^{3+} forma um complexo com reativo de FOX-2, que é detectado no comprimento de onda de 560nm (NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1994).

O nitrito é um produto do óxido nítrico (NO_2) que é convertido no oxidante peroxinitrito. O método se baseia na redução do NO_2 presente na amostra para NO_2^- . Essa molécula reage com o composto de Griess, formando coloração roxa. Essa reação é detectada no comprimento de onda de 540nm (GREEN *et al.*, 1982).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é essencial na modulação das concentrações de O_2 na célula, sendo utilizada como marcador para reações envolvendo essa molécula. O ácido pirogálico reage com o O_2 , formando produtos eletroativos que formam uma coloração amarelada. A reação é detectada no comprimento de onda de 440nm (GAO *et al.*, 1998).

3. Estatística

Foram utilizados os testes de Skillings-Mack para análise não-paramétrica de múltiplos grupos experimentais em blocos ao acaso com grupos desbalanceados (perda de parcelas), Kruskal-Wallis para avaliações não-paramétricas de múltiplos grupos, seguido pelo teste de Dunn como *post-hoc*. Para a avaliação do escore clínico foram utilizados os testes de chi-quadrado ou teste exato de Fisher, seguido do teste de Fisher pareado como *post-hoc*. Para variáveis paramétricas, foi utilizado o teste de ANOVA, com *post-hoc* realizado pelo teste de Tukey. As análises de redox foram testadas para outliers através do pacote outliers, e quando detectados, foram retirados. Todas as análises foram realizadas no software R, versão 4.3.0.

4. Resultados

4.1. Período pré-inoculação

Durante a realização do experimento, dois animais do grupo BA e um animal do grupo BAEO morreram antes da inoculação em decorrência de um surto de *Escherichia coli* com virotipo F4, Stb, LT. Não houve comprometimento significativo dos demais animais ou do estudo em decorrência desse surto.

4.2. Escore clínico

Foi realizada a avaliação do número de animais com diarreia por dia durante o período experimental. Para isso, animais com escore clínico maior que 2 foram considerados clinicamente com diarreia, sendo posteriormente contados quantos animais apresentaram ou não diarreia no período inteiro (dias com diarreia) e a cada dia, sendo excluídos animais que eventualmente não puderam ser avaliados clinicamente (ausência de fezes no reto). Houve

diferença estatística entre os grupos NC e PC ($p < 0,05$) e entre NC e BAEO ($p < 0,05$), baseado nos dias com diarreia, no período entre o desafio e o término do estudo, conforme Figura 4 e Tabela 4. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na avaliação diária (Figura 5 e Tabela 5), ressaltando-se o pequeno número amostral nessa avaliação. Em ambos os casos foi utilizado o teste exato de Fisher par a par. Além disso, três animais do grupo PC vieram a óbito ou tiveram de ser eutanasiados em decorrência do quadro clínico associado à *B. hyodysenteriae* (D07, D12 e D13). Um animal do grupo BA e um do grupo BAEO (D10 e D09, respectivamente) também vieram a óbito pelo quadro de disenteria suína.

Tabela 4. Tabela de contingência para a avaliação geral de dias com diarreia (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Grupo</i>	<i>Dias sem diarreia</i>	<i>Dias com diarreia</i>
NC	58	0
PC	42	14
BA	40	2
BAEO	38	10

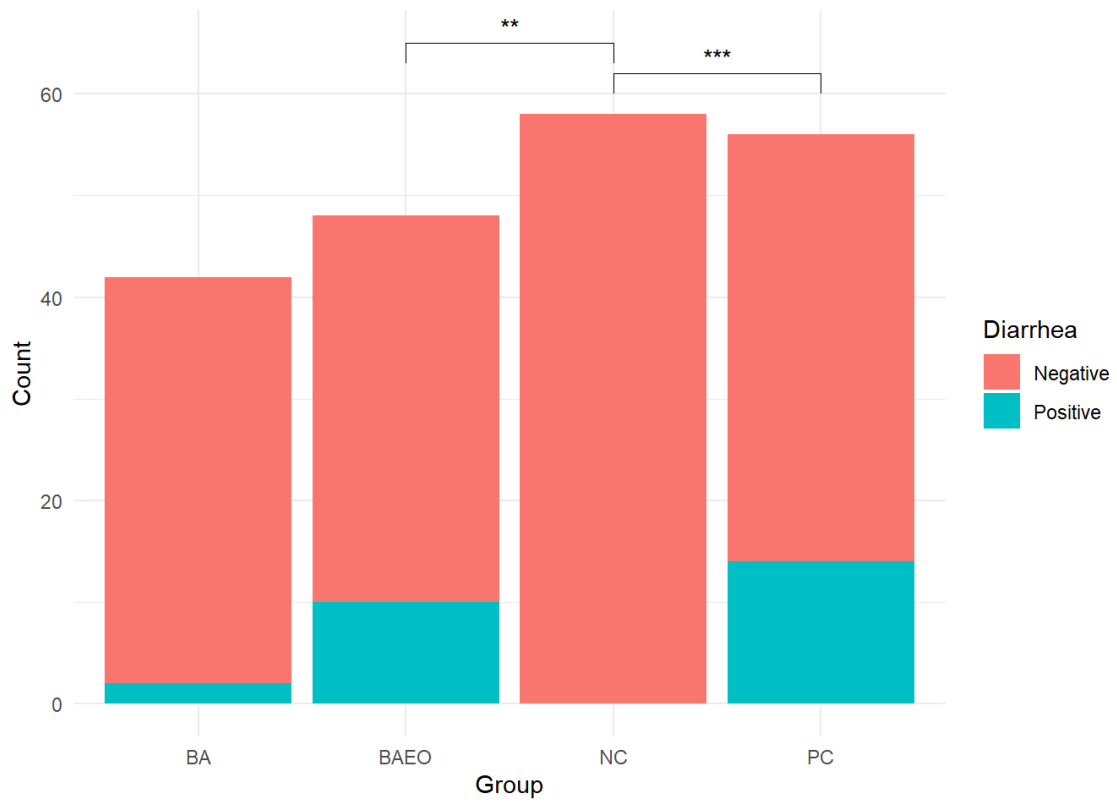


Figura 4. Dias com diarreia no período pós-inoculação por grupo (** - $p < 0.01$, *** - $p < 0,001$; (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

Tabela 5. Tabela de contingência para avaliação diária de animais com diarreia (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Grupo</i>	<i>Dias pós-inoculação</i>					
	D04		D07		D08	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>NC</i>	10	0	10	0	8	0
<i>PC</i>	10	0	8	0	9	1
<i>BA</i>	8	0	6	1	6	1
<i>BAEO</i>	9	0	7	1	8	1
<i>Grupo</i>	D11		D12		D13	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	<i>Controle Negativo</i>	10	0	10	0	10
<i>Controle Positivo</i>	6	4	5	5	4	4
<i>BA</i>	7	0	7	0	6	0
<i>BAEO</i>	5	3	5	2	4	3



Figura 5. Número de animais com diarreia no período pós-inoculação por dia (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

4.3. Ganho de peso

Não houve diferença estatística entre os grupos para ganho de peso antes ou depois da inoculação (Figura 6). Contudo, a variância nos grupos PC e BAEO após a inoculação (Gain_AI) foi grande, o que, somado ao pequeno número amostral usado nesse experimento, pode ter dificultado a percepção de diferenças estatísticas (Tabela 6).

Tabela 6. Médias e Coeficiente de Variação (CV) para peso (Kg) e ganho de peso antes (BI) e depois (AI) da inoculação (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

Grupo	Inicial	Pré-inoculação	Final	Ganho AI	Ganho PI
NC	4.76	10.3	17.1	5.59	6.8
PC	4.73	10.8	14.9	6.1	4.06
BA	4.89	9.84	15.7	4.95	5.86
BAEO	4.81	10.2	13.9	5.38	3.7
CV	22.32%	22.4%	26.2%	28.8%	54.46%

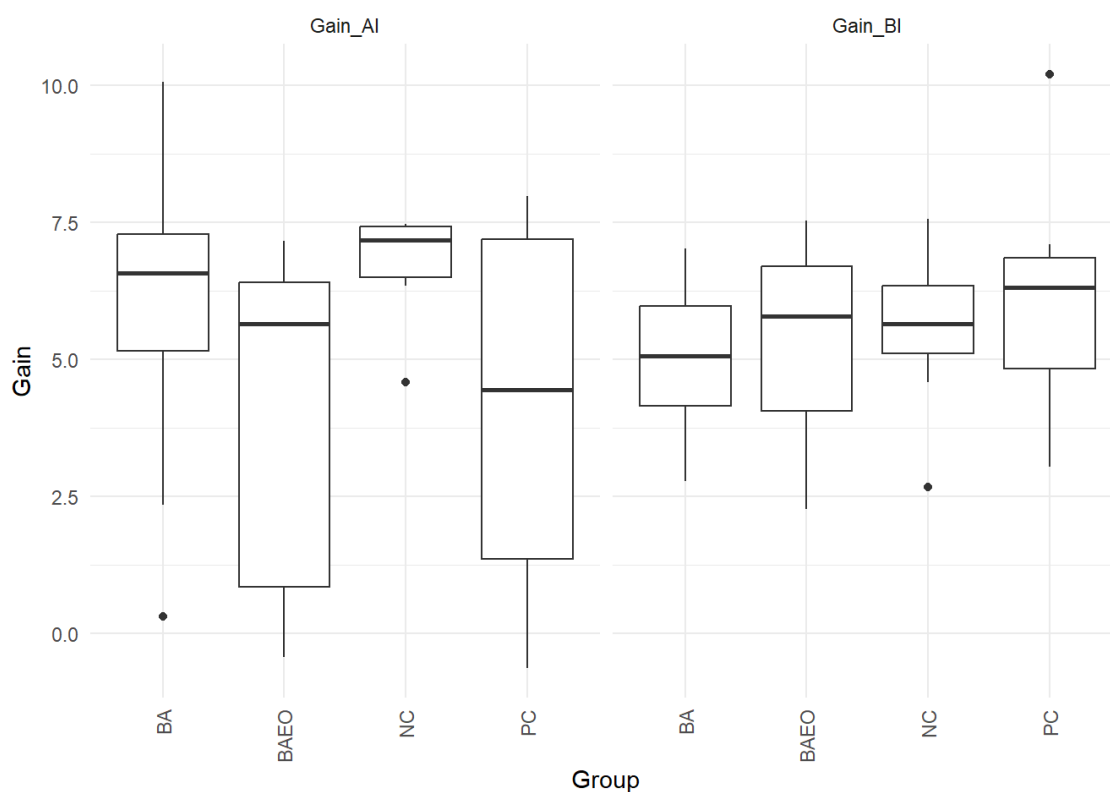


Figura 6. Ganho de peso antes (Gain_BI) e depois (Gain_AI) da inoculação (em Kg) (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

4.4. Lesões macroscópicas

Para avaliação de lesões macroscópicas individuais, foi utilizado um escore composto compreendido pela multiplicação entre o escore dado para a lesão e sua respectiva extensão (Figuras suplementares 1 a 3). O escore composto para lesões macroscópicas não apresentou

normalidade nem homoscedasticidade com os dados brutos. Contudo, após transformação logarítmica foi possível alcançar a normalidade, mas não homoscedasticidade. Dessa forma, foram realizadas análises não-paramétricas com os dados.

Nos testes não-paramétricos, a avaliação de Skillings-Mack revelou diferenças estatísticas, (Figura 7) entre os grupos NC e PC. Além disso, o grupo BA apresentou mediana 0, com apenas dois animais apresentando lesões macroscópicas, enquanto o grupo BAEO demonstrou mediana de 55 na avaliação de escore composto, com sete animais apresentando lesões. O grupo PC apresentou mediana de 234, também em sete animais (Tabela 7).

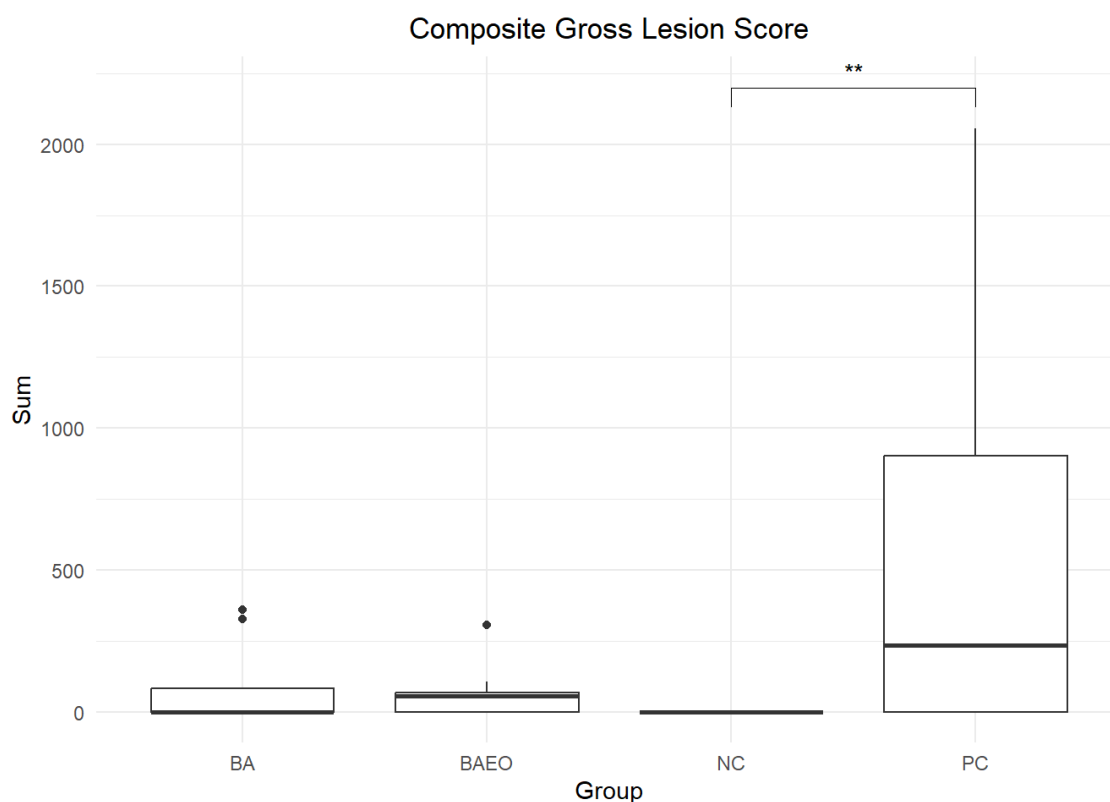


Figura 7. Escore composto (grau de lesão multiplicado pela extensão) de lesões macroscópicas avaliado pela análise de Skillings-Mack com *post-hoc* de Conover (** - $p < 0,01$; (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

Tabela 7. Moda e Mediana de lesões macroscópicas por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Grupo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Moda</i>
<i>NC</i>	0	0
<i>PC</i>	234	0
<i>BA</i>	0	0
<i>BAEO</i>	55	0

4.5. Lesões histológicas

Não houve diferenças estatísticas na avaliação de escore composto de lesões histológicas (Figura 8). A mediana do grupo NC foi 0, enquanto para o grupo PC foi 19,5, BA 3,5 e BAEO 5, com todos os grupos apresentando moda 0 (Tabela 8).

Ao se avaliar individualmente o escore composto para cada lesão, dois tipos de lesão apresentaram diferenças estatísticas entre grupos, sendo elas a necrose epitelial, onde foi detectada diferença estatística entre os grupos PC e NC, com maior valor de necrose no grupo PC, e hiperemia, onde o grupo PC apresentou maiores valores em relação aos demais grupos (Figura 9). O resultado de moda para todos os grupos e todas as variáveis foi 0, enquanto a única variável que apresentou mediana diferente de 0 foi a hiperplasia de células caliciformes no grupo PC, com mediana de 0,5 (Tabelas 9 e 10).

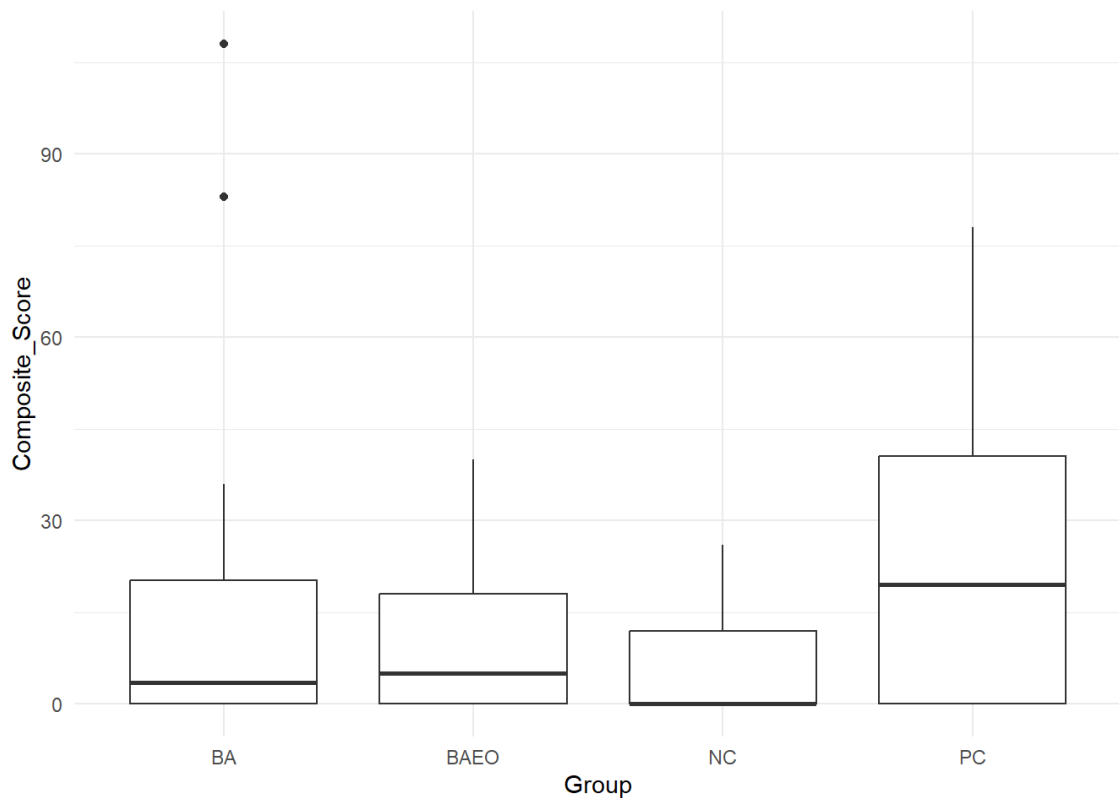


Figura 8. Escore composto (multiplicação entre grau de lesão, distribuição e peso) de lesões histológicas por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

Tabela 8. Moda e Mediana de lesões histológicas por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Grupo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Moda</i>
<i>NC</i>	0	0
<i>PC</i>	19,5	0
<i>BA</i>	3,5	0
<i>BAEO</i>	5	0

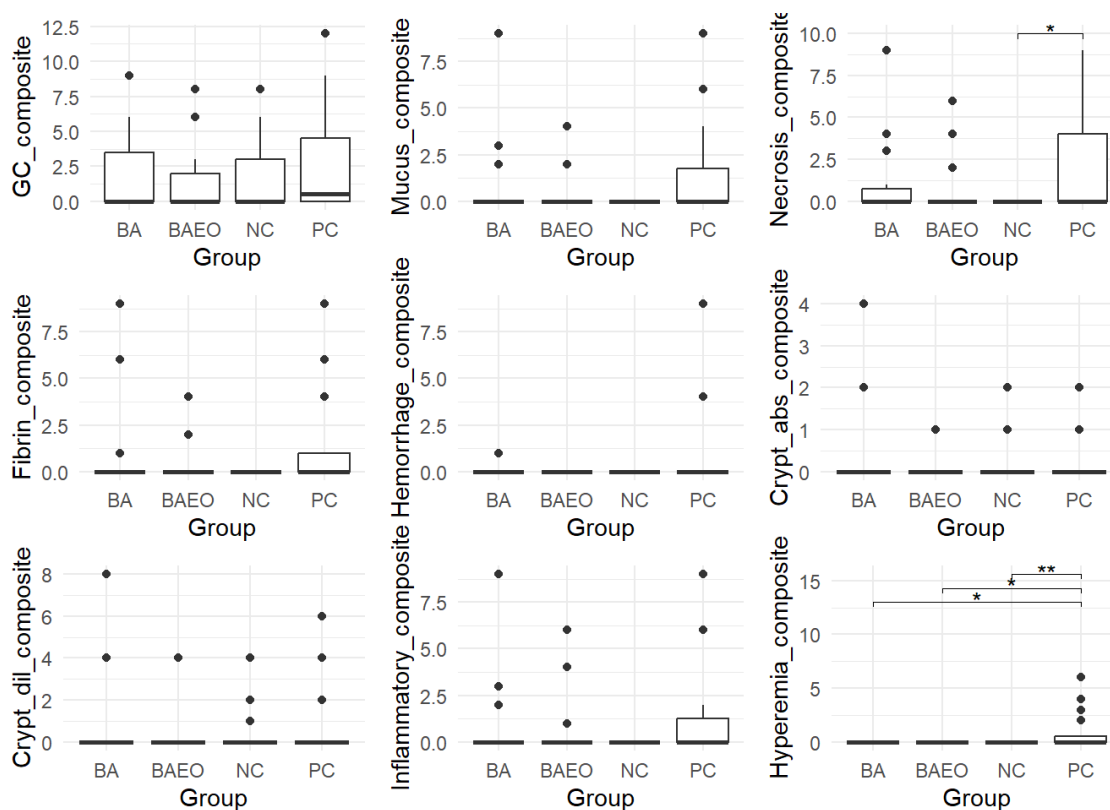


Figura 9. Lesões histológicas individualizadas, por grupo (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

4.6. qPCR

Durante o período pré-inoculação, não houve amplificação de material genético associado à *B. hyodysenteriae*. No primeiro dia após o final das inoculações foi possível detectar material genético associado à *B. hyodysenteriae* no grupo BA estatisticamente superior aos demais, que não apresentaram excreção do material genético alvo. No quinto dia pós-inoculação (dpi), o grupo PC apresentou, estatisticamente, maior excreção bacteriana do que o grupo NC, enquanto os grupos tratados (BA e BAEO) apresentaram resultados intermediários, mas sem diferença estatística desses grupos tratados com PC e NC. No oitavo dpi, os grupos BA e PC apresentaram maior excreção bacteriana em relação ao grupo NC. No 14º dpi, todos os grupos foram iguais estatisticamente (Figura 10). As medianas por grupo e por dpi podem ser observadas na Tabela 11.

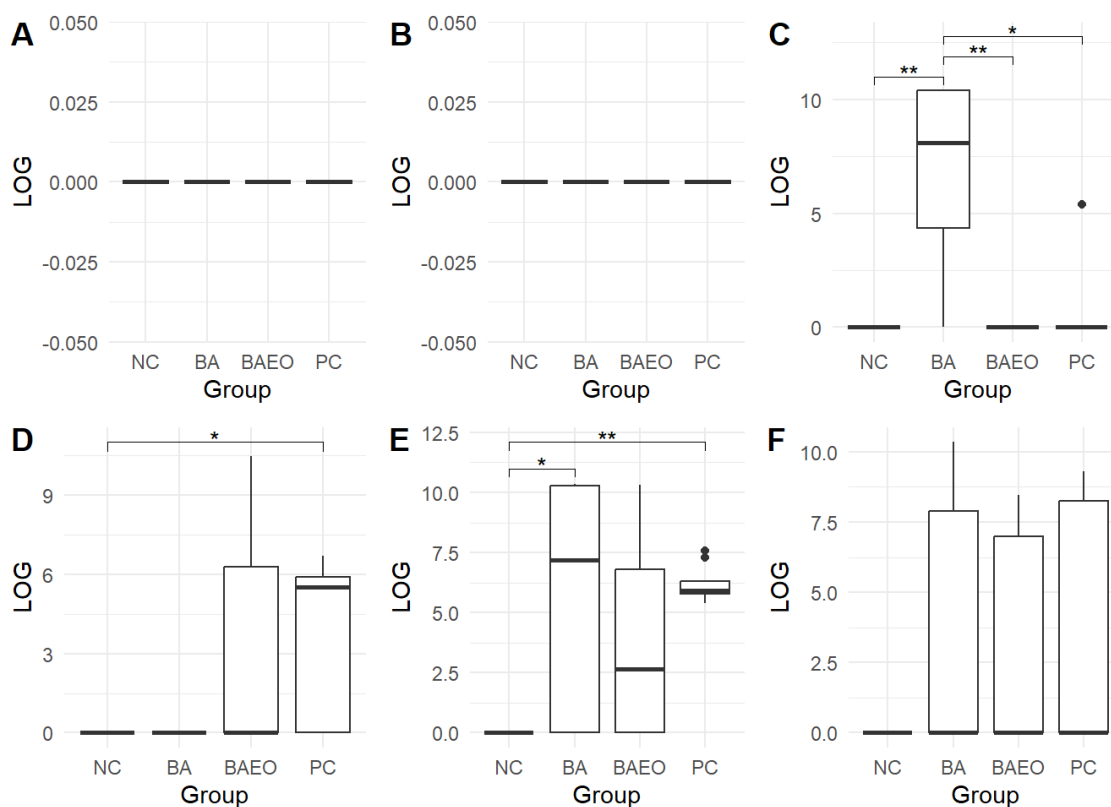


Figura 10. Excreção de material genético por grupo e dia pós-inoculação (A: -22dpi, B: -2dpi, C: 2dpi, D: 5dpi, E: 8dpi, e F: 14dpi) (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

Tabela 11. Mediana por grupo do log de Ct após correção (Ct-43,258/-3,329) (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

GRUPO	DPI -21	DPI -2	DPI 2	DPI 5	DPI 8	DPI 14
NC	0	0	0	0	0	0
BA	0	0	8,089	0	7,198	0
BAEO	0	0	0	0	2,643	0
PC	0	0	0	5,525	5,929	0

4.7. Atividade de enzimas antioxidantes

Foi avaliada a atividade de seis enzimas antioxidantes (redox): Catalase (CAT), Glutathione Reduzida (GSH), Glutathione S-transferase (GST), peróxido lipídico (LPO), óxido nítrico total (NO₂) e Superóxido Dismutase (SOD). Média e Desvio-padrão podem ser observados nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Todas as enzimas apresentaram distribuição normal e homoscedasticidade, com exceção de LPO de SOD, que, quando submetidas à transformação logarítmica, alcançaram normalidade e homoscedasticidade. Apenas um valor foi considerado *outlier* pelo teste de Grubbs, sendo excluído das análises posteriores.

A infecção pela *B. hyodysenteriae* não causou alterações nos níveis de CAT no raspado de mucosa intestinal, contudo, a suplementação com o ácido benzoico associado a óleos essenciais gerou um aumento significativo da atividade dessa enzima em relação à suplementação com ácido benzoico grau alimentar e ao NC (Figura 11).

Da mesma forma, não houve diferenças estatísticas entre os grupos PC e NC na avaliação de GSH, sugerindo que não há alterações na atividade dessa enzima pela DS, contudo, a suplementação com o ácido benzoico associado a óleos essenciais gerou um aumento estatístico da atividade de GSH em relação ao grupo NC (Figura 12). Contudo, a avaliação de GST revelou um aumento expressivo do grupo PC em relação aos demais, sugerindo que a *B. hyodysenteriae* é capaz de induzir aumento na atividade dessa enzima, que foi controlado pela suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado (Figura 13).

Não houve alterações no perfil de peroxidação lipídica (LPO) em nenhum grupo (Figura 14), enquanto, surpreendentemente, os níveis de NO₂ foram estatisticamente menores no grupo CP em relação ao grupo CN, alteração que não pode ser corrigida por nenhuma suplementação com ácido benzoico grau alimentar ou associado (Figura 15). Por fim, a atividade da SOD foi estatisticamente maior em todos os grupos quando comparados ao NC, contudo, o grupo suplementado com o ácido benzoico associado a óleos essenciais conseguiu reduzir a atividade de SOD em relação ao grupo PC, sem ser capaz de retornar aos níveis basais observados no grupo NC (Figura 16).

Tabela 12. Médias para enzimas Redox por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Grupo</i>	<i>CAT</i> (U/ml)	<i>GSH</i> (pmol/ml)	<i>GST</i> (mU/ml)	<i>LPO</i> (mmol/ml)	<i>NO2</i> (μM/ml)	<i>SOD</i> (U/ml)
<i>CN</i>	14.213198	26.11916	102.6042	315.6589	381.2894	1373.148
<i>CP</i>	12.246193	27.82101	199.6745	309.8837	192.7115	4387.080
<i>BA</i>	9.862219	28.98122	119.8661	344.6290	299.7615	3772.838
<i>BAEO</i>	17.322335	29.73469	142.6432	221.2209	256.8890	2321.102

Tabela 13. Desvio Padrão para enzimas Redox por grupo (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

<i>Grupo</i>	<i>CAT</i>	<i>GSH</i>	<i>GST</i>	<i>LPO</i>	<i>NO2</i>	<i>SOD</i>
<i>CN</i>	21.701786	2.520869	35.55681	123.1563	128.6870	238.2824
<i>CP</i>	4.189740	2.185536	48.53695	118.4861	137.3544	1017.4950
<i>BA</i>	2.090014	1.732297	29.42352	127.9210	109.1231	1765.8076
<i>BAEO</i>	4.437219	2.201117	26.55803	112.0983	157.6034	839.8906

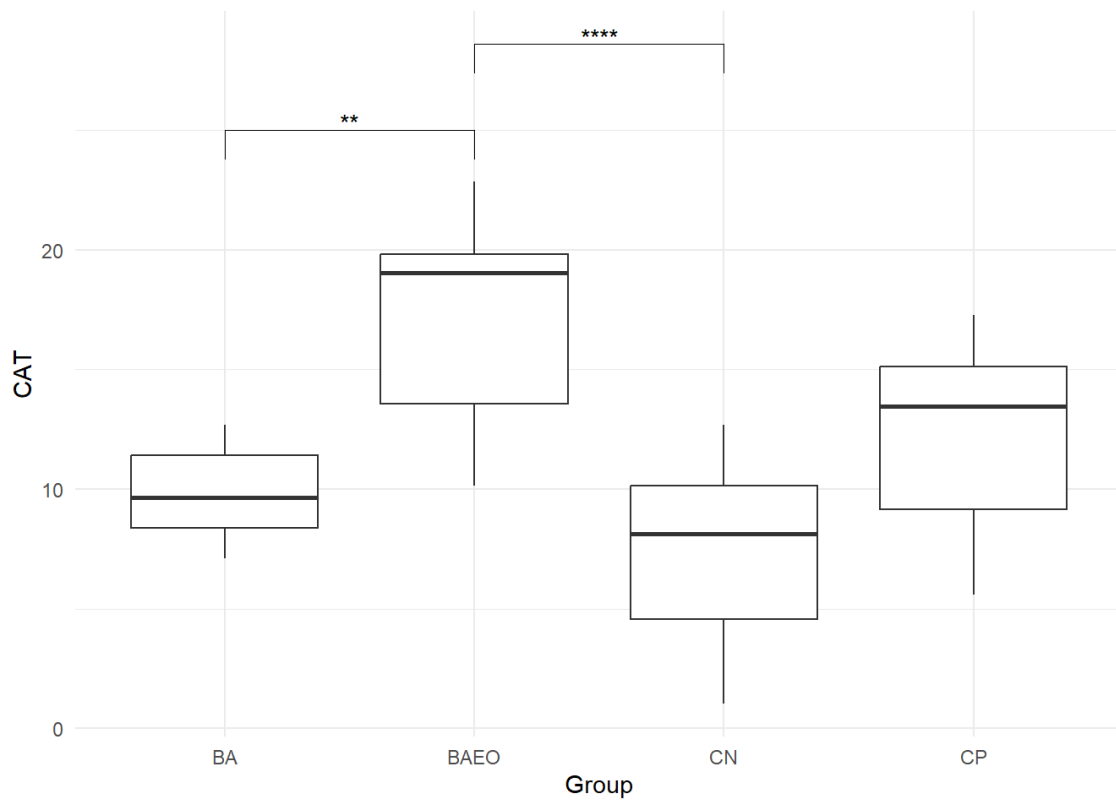


Figura 11. Avaliação da atividade de CAT (em U/ml) (** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

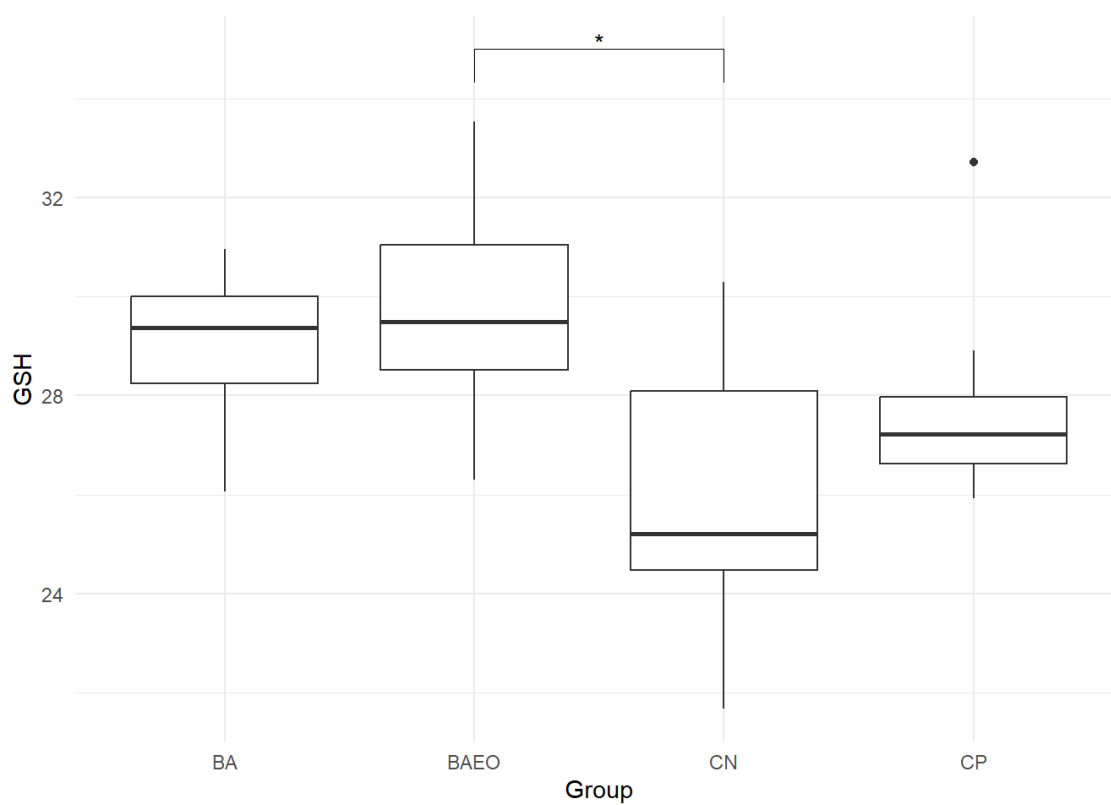


Figura 12. Avaliação da atividade de GSH (em pmol/ml; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

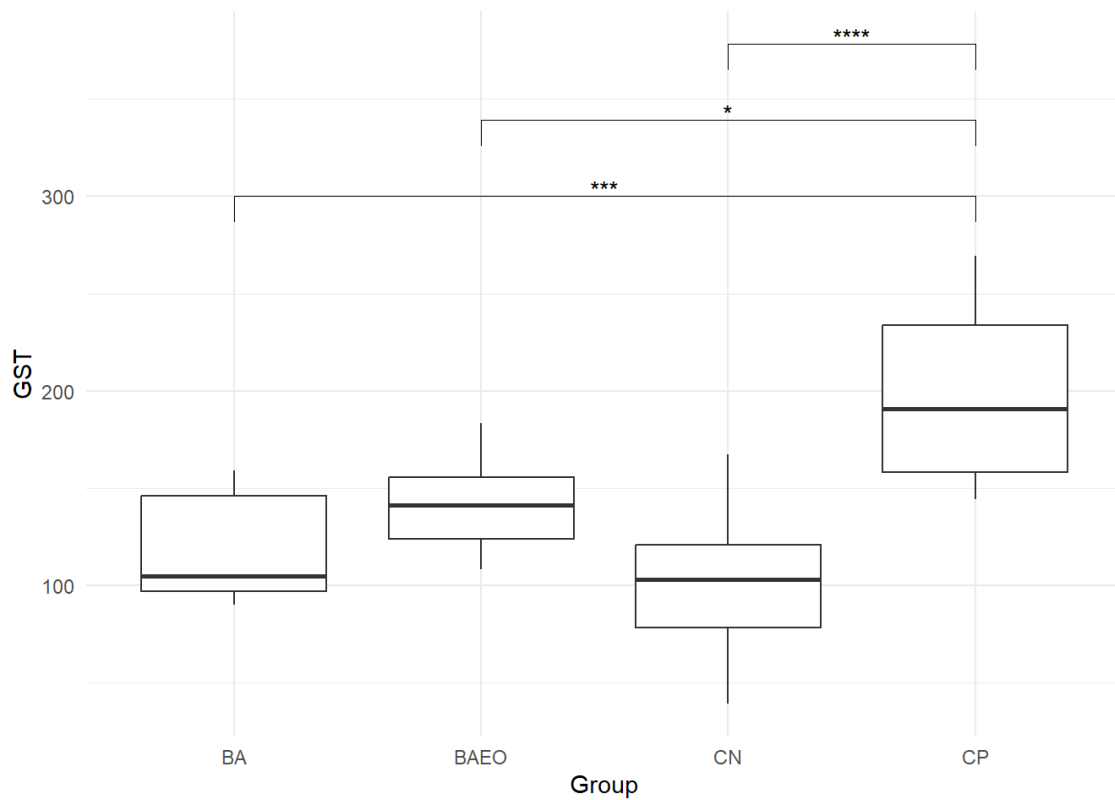


Figura 13. Avaliação da atividade de GST (em mU/ml) (* - $p < 0,5$; *** $p < 0,001$; **** - $p < 0,00001$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

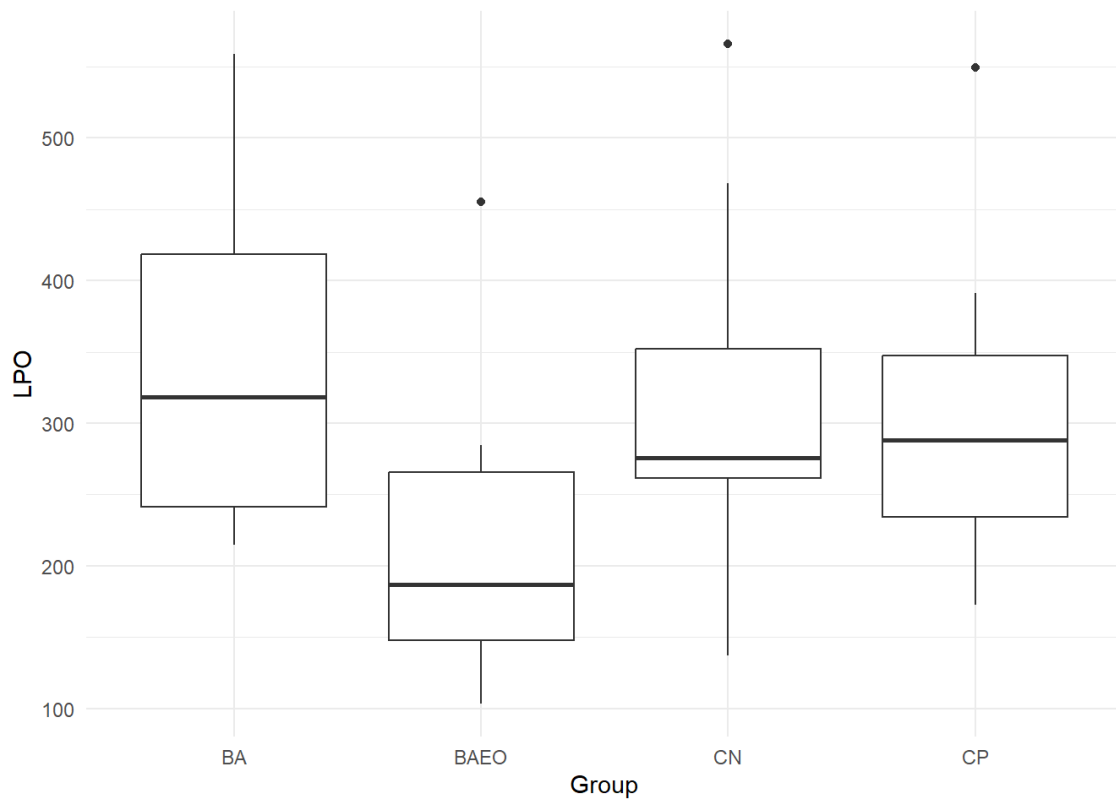


Figura 14. Avaliação da atividade de LPO (em mmol/ml) (BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

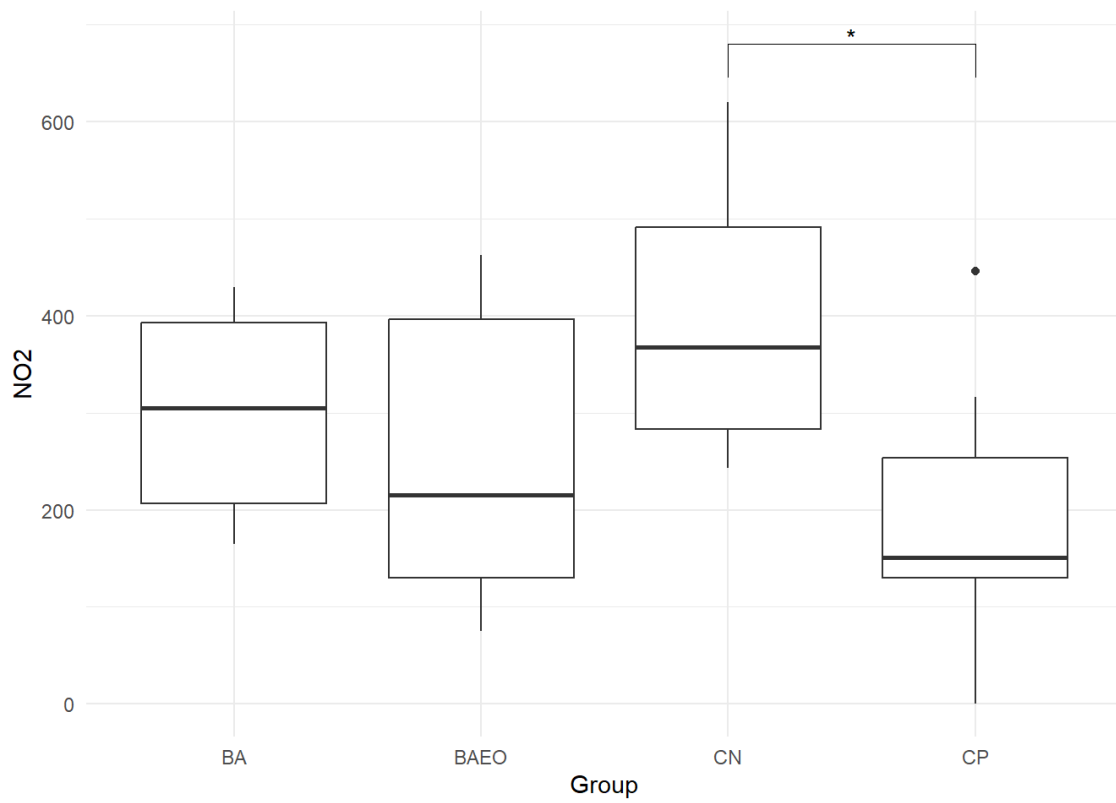


Figura 15. Avaliação da atividade de NO₂ (em µM/ml) (* - p<0,05; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

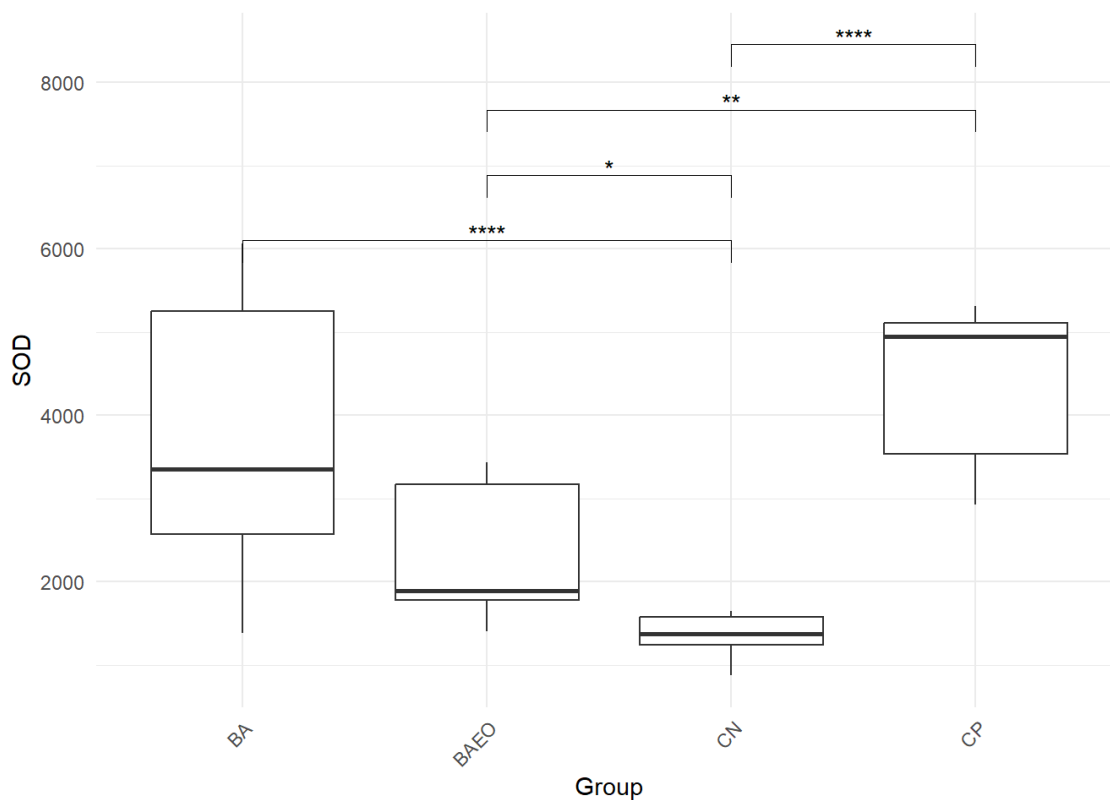


Figura 16. Avaliação da atividade de SOD (em U/ml) (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$; BA – Ácido benzoico grau alimentar; BAEO – Ácido benzoico associado a óleos essenciais; PC – Controle Positivo; NC – Controle negativo)

5. Discussão

Esse é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da suplementação com ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais frente um desafio experimental de *B. hyodysenteriae*. Estudos demonstrando a eficácia de produtos alternativos aos antimicrobianos no controle da DS são escassos, sendo realizados testes principalmente *in vitro* (BERNARDEAU et al., 2009; KUTASI et al., 2016; VANDE MAELE et al., 2016; DE NOVA et al., 2017). Apesar de servirem como indícios para a eventual eficácia dos produtos avaliados, a complexidade de um sistema biológico, farmacocinética e farmacodinâmica podem alterar completamente os resultados em um experimento *in vivo* (SAEIDNIA et al., 2016). Dessa forma, os resultados obtidos no experimento *in vitro* podem ser utilizados como marco inicial para o desenvolvimento de produtos à base de ácido benzoico grau alimentar e sua associação a óleos essenciais, tendo-se o cuidado de considerar a concentração que estará disponível no sítio de infecção do agente.

Os mecanismos de ação do ácido benzoico sobre os microrganismos não são totalmente conhecidos, sendo propostos como potenciais mecanismos envolvidos a difusão da forma não dissociada pela parede celular e destruição ou inibição de enzimas citoplasmáticas, a acidificação do meio intestinal e estomacal, ativando enzimas e servindo como barreira para a colonização de bactérias potencialmente patogênicas (MROZ, 2005). Ações indiretas também são relatadas no efeito nutracêutico do ácido benzoico, como modulação de microbiota, aumento da expressão de proteínas de junção oclusiva intestinal, alterações no perfil inflamatório e produção de mucinas (UPADHAYA et al., 2016; PHAM et al., 2022; NOURI, 2023). A suplementação com ácido benzoico em suínos já foi avaliada anteriormente em diferentes níveis de inclusão, com resultados geralmente positivos para as avaliações de ganho de peso e parâmetros intestinais, contudo, poucos estudos avaliaram seu efeito frente à desafios com patógenos entéricos, apresentando poucos resultados no controle de sinais clínicos relacionados (KLUGE et al., 2006; DIAO et al., 2014; MAO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020; ZHAI et al., 2020; WANG, et al., 2021).

A reprodução experimental da DS é complexa e, por vezes, frustrante, com experimentos perdidos pela ausência de sinais clínicos típicos da doença. Diferentes estratégias foram testadas anteriormente (PARRA-AGUIRRE, et al., 2023), contudo, um protocolo definitivo para a DS ainda não é possível. Dessa forma, para tentar minimizar as chances de falha, foi realizada a curva de crescimento bacteriano, que demonstrou um crescimento exponencial entre 15 e 20 horas, com a inoculação sendo realizada entre 16-18 horas de crescimento. Sugerimos que futuros experimentos avaliem o crescimento das cepas a serem utilizadas como inóculo e busquem tempos de inoculação dentro do período exponencial de crescimento, objetivando uma maior

probabilidade de sobrevivência bacteriana no trato gastrointestinal e maiores concentrações cheguem ao intestino grosso, área de colonização da *B. hyodysenteriae*. Outro fator importante em inoculações experimentais é a concentração de bactérias no inóculo utilizado. O presente estudo utilizou três doses de 50ml com uma média de $1,7 \times 10^9$ bactérias/ml, totalizando $8,5 \times 10^{10}$ bactérias por animal por dia, um valor próximo a outro experimento (PARRA-AGUIRRE et al., 2023). O uso de um inóculo com alta concentração de bactérias no momento ideal não reflete as condições à campo, contudo, metodologias de inoculação que simulem as rotas de infecção natural para a DS não obtiveram sucesso no desenvolvimento do quadro clínico típico da doença (PARRA-AGUIRRE et al., 2022) quando a proporção entre os animais semeadores e animais sadios era inferior a 1:2 (um semeador para dois sadios).

Os animais iniciaram com o quadro de diarreia entre o 7º e 8º dpi (Figura 5, Figura suplementar 4), com o maior número de animais com diarreia ocorrendo nos dias 11, 12 e 13, conforme já relatado anteriormente (WILCOCK & OLANDER, 1979). Atualmente, acredita-se que a diarreia é causada por alterações no metabolismo secretório e de reabsorção de íons, principalmente sódio (Na), em decorrência da redução das concentrações de transportadores (ENNS *et al.*, 2020). A diarreia é o principal sinal clínico da DS (BURROUGH, 2017), podendo levar animais ao óbito em decorrência da desidratação. Não foram detectadas diferenças estatísticas no quadro clínico apresentado pelos grupos tratados em relação ao controle positivo, contudo, o grupo suplementado com BAEO foi estatisticamente diferente do grupo NC, indicando que a suplementação não foi capaz de inibir o quadro clínico da DS. Apesar de se tratar de um composto protegido para liberação intestinal, a menor taxa de inclusão na dieta (3kg/t) e a menor concentração de ácido benzoico grau alimentar pode ter reduzido os níveis intestinais do composto, enquanto a associação à óleos essenciais parece não ter efeito sinérgico (VANDE MAELE *et al.*, 2016), e sim aditivos. Outros estudos também não observaram efeito da suplementação no quadro clínico (HALAS *et al.*, 2010; PU *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020).

O grupo BA apresentou resultados intermediários, ou seja, estatisticamente indistintos ao grupo PC ($p = 0,067$) e NC ($p = 1$). Além disso, no grupo BA só foram detectados animais com diarreia em dois dias experimentais (D7 e D8, Figura 5), período com a segunda maior excreção de bactérias pelas fezes (Figura 10). Levando em consideração esses resultados, é possível que a suplementação com ácido benzoico grau alimentar tenha efeito na redução do quadro clínico de diarreia e, inicialmente, na excreção de *B. hyodysenteriae* (5 dpi, $p = 0,07$), o que por sua vez auxiliaria no controle da disseminação da doença no rebanho devido à redução da eliminação de bactérias e, conseqüentemente, menor transmissão (BARFIELD *et al.*, 2015).

Não foram observadas diferenças estatísticas no ganho de peso nem peso final entre os grupos (Figura 6), contudo, observou-se um aumento no coeficiente de variação para o ganho de peso no período pós-inoculação (Tabela 6). O pequeno número de animais avaliados associado ao aumento no coeficiente de variação podem ter dificultado a detecção de diferenças, uma vez que KLUGE et al. (2006) e outros (UPADHAYA et al., 2016; ZHAI et al., 2020), avaliando o efeito da suplementação com ácido benzoico, encontraram um maior ganho de peso de animais suplementados.

Apesar de reduzir numericamente as lesões macroscópicas, particularmente no grupo BA, a suplementação com o BA e BAEO não foi suficiente para reduzir significativamente as lesões macroscópicas observadas em relação ao grupo PC, sendo edema e hiperemia de mucosa as lesões mais frequentes. Histologicamente, isso se reflete com menor intensidade, com uma redução numérica nos valores de escore composto, mas sem diferenças estatísticas, com exceção para hiperemia (Figura 9), que foi estatisticamente menor em todos os grupos quando comparados em relação ao controle positivo. As lesões encontradas são compatíveis com as descritas na literatura (HAMPSON & BURROUGH, 2019; WILCOCK & OLANDER, 1979), contudo, não foram encontrados trabalhos avaliando o impacto da suplementação com nutracêuticos nas lesões de intestino grosso. Um estudo avaliando o efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa demonstrou efeito protetivo em lesões isquêmicas induzidas no íleo de leitões (JACOBI *et al.*, 2012). Outro estudo, avaliando a suplementação com chito-oligossacarídeos em *explants* jejunais demonstrou eficácia na preservação das características histológicas desses fragmentos (GEREZ *et al.*, 2019). Apesar dos efeitos terem sido avaliados em fragmentos de intestino delgado e sem a presença de um patógeno, esses resultados podem indicar uma capacidade protetiva aos enterócitos por parte dos nutracêuticos.

A excreção de *B. hyodysenteriae* pela técnica de qPCR só foi confirmada no 2º dpi (Figura 10), sendo as ampliações observadas nos dias anteriores inespecíficas e em Ct acima do limite de detecção e quantificação (10^3) estabelecido para o nosso teste. Essa detecção precoce pode estar associada à eliminação de bactérias do próprio inóculo, que falharam em colonizar o intestino grosso. Nos demais dias, com exceção do 14 dpi, o grupo PC foi estatisticamente superior ao NC em todas as avaliações, indicando o sucesso do modelo experimental pela colonização intestinal pela *B. hyodysenteriae*. Os grupos suplementados não apresentaram redução estatística da eliminação bacteriana, contudo, aos 5 dpi, o grupo BA apresentou mediana zero, enquanto o grupo PC apresentou uma mediana de 5,93 ($p=0,07$), mostrando uma tendência de redução da excreção bacteriana. Outro ponto importante é que a variância nos grupos suplementados foi quase 40 vezes maior, sendo um fator importante na detecção de

potenciais diferenças. A redução da excreção de bactérias pode auxiliar no controle da disseminação da DS dentro de um rebanho (BARFIELD *et al.*, 2015). Além disso, o uso de nutracêuticos como ácidos orgânicos, prebióticos e óleos essenciais, geraram a redução da excreção de *Salmonella* (CALVEYRA *et al.*, 2012; RUGGERI *et al.*, 2018; VENARDOU *et al.*, 2022), tanto em compostos avaliados isoladamente quanto associados, indicando um potencial efeito desses produtos como redutores de carga infectante ambiental e, conseqüentemente, redução de sinais clínicos e infecções por organismos entéricos patogênicos.

Há pouca informação acerca da importância do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes nas patologias gastrointestinais em suínos. Sabe-se, contudo, que é necessário um equilíbrio entre a presença agentes oxidantes e mecanismos antioxidantes para um correto funcionamento intestinal (LAURIDSEN, 2019). Nossos resultados demonstram que, para as seis enzimas avaliadas, a *B. hyodysenteriae* gerou alterações significativas em três: SOD, GST e NO₂, em relação ao grupo NC. A SOD é uma família de enzimas responsável pela quebra do superóxido (O₂^{*}), que são moderadamente reativos, mas incapazes de difundir passivamente pela membrana celular, dada sua carga (GHOSH *et al.*, 2022). CHMIELEWSKA *et al.* (2013) avaliaram a expressão de SOD mitocondrial, citoplasmática e extracelular em suínos, encontraram um aumento na expressão de SOD, principalmente na camada muscular, corroborando os resultados encontrados no presente estudo (Figura 16). Os mecanismos e implicações associados a essa alteração não são conhecidos, podendo estar relacionado a uma resposta fisiológica à infecção pela *B. hyodysenteriae*. A suplementação com AB e ABEO não foi capaz de retornar à atividade de SOD à níveis comparados ao NC, contudo, o grupo ABEO apresentou menor atividade quando comparado ao grupo PC, o que pode estar relacionado aos óleos essenciais presentes, uma vez que alguns óleos essenciais podem apresentar efeitos antioxidante (KIM *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2020; WANG, *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2022).

No sistema fisiológico, a glutathione S-transferase pode exercer uma gama de funções, dentre elas o metabolismo de xenobióticos e carreamento de proteínas de forma não enzimática, existindo diversas classes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015). Dentre essas funções, destacam-se, para o presente trabalho, a reação com peróxidos orgânicos e peroxidação lipídica. Um dos produtos da peroxidação do ácido araquidônico é a prostaglandina G₂, um peróxido orgânico (SMITH & MARNETT, 1991), provável alvo para a GST. Os mecanismos inflamatórios envolvidos na infecção pela *B. hyodysenteriae* não são totalmente conhecidos (JONASSON *et al.*, 2006; HAMPSON & BURROUGH, 2019), então, uma hipótese levantada é que o aumento da atividade de GST observado (Figura 13) pode estar correlacionado à produção de prostaglandina G₂ pela cicloxigenase em resposta à infecção pela *B. hyodysenteriae*. É importante ressaltar que a

prostaglandina G2 ativa a produção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase (NOS) (FOLEY, 2001), que será discutida a seguir.

Existem duas formas de expressão do óxido nítrico (NO) nos sistemas biológicos, constitutiva, com duas isoformas descritas (NOS-1 e NOS-3), e induzida, presente apenas em tecidos ativado, sendo chamada iNOS ou NOS-2 (COLEMAN, 2001). A produção de NO constitutiva ocorre em decorrência de um sinal de cálcio, enquanto a indutiva se dá pela ação de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e/ou citocinas (COLEMAN, 2001). Em contraste ao proposto por WELLE et al. (2017), os níveis de NO, mensurados a partir do nitrito, foram menores no grupo PC em comparação ao grupo NC (Figura 15). WELLE et al. (2017) correlacionam e teorizam o aumento de NO pela redução de L-arginina e aumento de L-citrulina em explantes desafiados com *B. hyodysenteriae*, contudo, em um único tempo (8 horas de exposição). O pequeno tempo e a ausência de um sistema orgânico completo podem ter influenciado os resultados obtidos por WELLE et al. (2017). Levantamos a hipótese que, em um primeiro momento, o mecanismo apontado por WELLE et al. (2017) ocorre, mas a longo prazo, o aumento de GST suplanta a ativação das vias de produção da iNOS, principalmente pela degradação da prostaglandina G2. Outro mecanismo que pode estar associado à menor concentração de NO nos animais do grupo PC é a redução do influxo de cálcio causada pela *B. hyodysenteriae* (ENNS et al., 2019), que por sua vez geraria uma menor produção da forma constitutiva do NO, dependente do influxo de cálcio. Sugerimos que futuros estudos avaliem a produção de prostaglandina G2 em quadros de DS, além da avaliação individual das isoformas (NOS-1, NOS-2 e NOS-3) para melhor esclarecer e elucidar o papel e quais vias estão alteradas na produção de NO, bem como buscar avaliar o mecanismo envolvidos no estresse oxidativo aparentemente gerado pela *B. hyodysenteriae*.

Para as demais enzimas, a infecção pela *B. hyodysenteriae* não gerou alterações significativas. Contudo, a suplementação com BAEO levou a um aumento da atividade da glutathiona (GSH) e peroxidação lipídica (LPO). O aumento da LPO chama atenção devido à atividade antioxidante descrita anteriormente para óleos essenciais, revelando assim um efeito paradoxal. Uma possível explicação é a microencapsulação, aplicada para melhorar a palatabilidade e controlar a liberação dos princípios ativos presentes no produto comercial. Uma das metodologias de microencapsulação envolve a proteção dos princípios em uma matriz lipídica (PIVA et al., 2007; TOLVE et al., 2021), que pode estar envolvida no aumento observado.

Esse é o primeiro estudo avaliando os efeitos da suplementação com ácido benzoico grau alimentar e associado a óleos essenciais sobre a DS, avaliando seus aspectos clínico-patológicos, a excreção bacteriana e demonstrando os efeitos da suplementação e da infecção pela *B. hyodysenteriae* sobre o estresse oxidativo na mucosa cecal. Nossos resultados revelam pouca

atividade antimicrobiana *in vivo* principalmente na prevenção de lesões macro e microscópicas nos níveis de suplementação utilizados, com um único pico de excreção fecal de *B. hyodysenteriae* nos períodos avaliados, possivelmente pela perda e, conseqüentemente, redução da concentração de ácido benzoico no ceco e cólon em decorrência da metabolização e absorção do princípio ativo no decorrer do trato gastrointestinal.

Novos estudos são necessários para elucidar a relação entre o estresse oxidativo e as lesões intestinais causadas, bem como avaliar os possíveis efeitos temporais do estresse oxidativo, traçando um perfil sequencial das alterações impostas no perfil antioxidante intestinal em decorrência da infecção. Por fim, possíveis mecanismos ligados à bactéria para as alterações observadas devem ser avaliados, elucidando um pouco mais a patogenia da *B. hyodysenteriae* e permitindo, possivelmente, o desenvolvimento de metodologias de controle e erradicação livres do uso de qualquer antimicrobiano.

Conclusão geral

Apesar do estudo *in vitro* ter revelado um potencial antimicrobiano do ácido benzoico, tanto grau alimentar quanto associado a óleos essenciais, não foi possível detectar melhoras estatísticas clínico-patológicas ou mesmo na excreção da *B. hyodysenteriae* na suplementação *in vivo* na concentração de 5kg/t. Contudo, as alterações de enzimas antioxidantes encontradas ilustram uma área pouco pesquisada acerca da DS, podendo revelar aspectos importantes da patogênese da doença e permitir traçar novas estratégias de controle.

6. Referências

ABUOUN, Manal *et al.* A genomic epidemiological study shows that prevalence of antimicrobial resistance in enterobacterales is associated with the livestock host, as well as antimicrobial usage. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 10, p. 630, 2021.

ACHACHA, M.; MESSIER, S. Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 1, p. 249–251, 1992.

AEBI, Hugo. Catalase in vitro. In: PACKER, LESTER (Org.). *Oxygen Radicals in Biological Systems*. [S.l: s.n.], 1984. p. 121–126.

ALLEN, Heather K. *et al.* Treatment, promotion, commotion: Antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 3, p. 114–119, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.001>>.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, Avelino *et al.* Swine dysentery: Aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, n. 5, p. 1927–1947, 2013.

AMBROSIO, C. M.S.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; DA GLORIA, E. M. In vitro mechanism of antibacterial action of a citrus essential oil on an enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 129, n. 3, p. 541–553, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article/129/3/541/6714737>>. Acesso em: 6 fev. 2023.

ARAÚJO, Matheus Dias. *Padronização da técnica de microdiluição em caldo e avaliação da sensibilidade antimicrobiana a óleos essenciais para isolados brasileiros de Brachyspira hyodysenteriae*. 2020. 1–57 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. *Relatório Anual 2023*. [S.l: s.n.], 2023.

BALLOU, Michael A.; DAVIS, Emily M.; KASL, Benjamin A. Nutraceuticals: An Alternative Strategy for the Use of Antimicrobials. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, v. 35, n. 3, p. 507–534, 2019.

BARCELLOS, D. E.S.N. *et al.* Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Veterinary Record*, v. 146, n. 14, p. 398–403, 2000.

BARFIELD, Michael; ORIVE, Maria E.; HOLT, Robert D. The role of pathogen shedding in linking within- and between-host pathogen dynamics. *Mathematical Biosciences*, v. 270, p. 249–262, 1 dez. 2015.

BARTON, Mary D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, v. 13, n. 2, p. 279–299, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/095442200108729106>>.

BELGARD, Matthew I. *et al.* Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS ONE*, v. 4, n. 3, 2009.

BERNARDEAU, Marion *et al.* In vitro antagonistic activities of *Lactobacillus* spp. against *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *Veterinary Microbiology*, v. 138, n. 1–2, p. 184–190, 2 jul. 2009.

BIKSI, Imre *et al.* Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 55, n. 2, p. 219–227, 2007.

BLACK, Michael *et al.* Analysis of multiple *Brachyspira hyodysenteriae* genomes confirms that the species is relatively conserved but has potentially important strain variation. *PLoS ONE*, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

BOERLIN, Patrick; WHITE, David G. Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology. In: GIGUÈRE, STEEVE; PRESCOTT, JOHN F.; DOWLING, PATRICIA M. (Org.). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2013. p. 21–40.

BONETTI, Andrea *et al.* Nature-identical compounds and organic acids reduce *E. Coli* K88 growth and virulence gene expression in vitro. *Toxins*, v. 12, n. 8, p. 468, 23 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/12/8/468/htm>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

BOYE, M. *et al.* Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Molecular and Cellular Probes*, v. 12, n. 5, p. 323–330, 1998.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 13 DE JANEIRO DE 2020. *Diário Oficial da União*. Brasil: [s.n.], 13 jan. 2020

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº- 14, DE 15 DE JULHO DE 2016. *Diário Oficial da União*. Brazil: [s.n.], 15 jul. 2016a

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 17 DE MAIO DE 2012. *Diário Oficial da União*. Brazil: Diário Oficial da União., 17 maio 2012

BRASIL. Instrução normativa nº 41, de 23 de Outubro de 2017. *Diário Oficial da União*. Brasil: Diário Oficial da União., 2017

BRASIL. *Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 45, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2016. Diário Oficial da União*. Brasil: Diário Oficial da União. , 2016b

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, v. 158, n. 1–2, p. 1–14, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>>.

BURROUGH, E. R. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging Disease. *Veterinary Pathology*, v. 54, n. 1, p. 22–31, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0300985816653795>>.

BURROUGH, Eric R. *et al.* Fluorescent in situ hybridization for detection of “*Brachyspira hamptonii*” in porcine colonic tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 25, n. 3, p. 407–412, 9 abr. 2013. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638713485228>>. Acesso em: 11 abr. 2023.

CALDERARO, A. *et al.* Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 105, n. 3–4, p. 229–234, 2005.

CALVEYRA, J. C. *et al.* Effect of organic acids and mannanoligosaccharide on excretion of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected growing pigs. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 1, p. 46–47, 1 ago. 2012. Acesso em: 12 out. 2021.

CARD, Roderick M. *et al.* Identification of a new antimicrobial resistance gene provides fresh insights into pleuromutilin resistance in *Brachyspira hyodysenteriae*, aetiological agent of swine dysentery. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. 1183, 2018.

CARD, Roderick M *et al.* Weakly haemolytic variants of *Brachyspira hyodysenteriae* newly emerged in Europe belong to a distinct subclade with unique genetic properties. *Veterinary Research*, v. 50, n. 21, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13567-019-0639-x>>. Acesso em: 9 maio 2022.

CARVAJAL, A *et al.* Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Veterinary Record*, v. 158, p. 700–701, 2006.

CHERRINGTON, C. A. *et al.* Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. *Advances in Microbial Physiology*, v. 32, n. C, p. 87–108, 1991.

CHMIELEWSKA, M. *et al.* The expression of mitochondrial, cytoplasmic and extracellular superoxide dismutase in the colonic wall of pigs suffering from swine dysentery. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 16, n. 3, p. 463–467, 2013.

CIESINSKI, Lisa *et al.* High dietary zinc feeding promotes persistence of multi-resistant E. coli in the swine gut. *PLoS ONE*, v. 13, n. 1, 1 jan. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5786291/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

COLEMAN, John W. *Nitric oxide in immunity and inflammation. International Immunopharmacology*. [S.l: s.n.], 2001. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/intimp>.

CYBULSKI, Piotr *et al.* First molecular detection of *Brachyspira suanatina* on pig farms in Poland. *Helminthologia (Poland)*, v. 67, n. 3, p. 353–359, 1 set. 2023.

DANIEL, Amanda G.S. *et al.* Minimum inhibitory concentration of Brazilian *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 37, n. 4, p. 331–338, 2017.

DANIEL, Amanda G.S. *et al.* Synergic Effect of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* Coinfection: Anatomopathological and Microbiome Evaluation. *Animals*, v. 13, n. 16, 1 ago. 2023.

DARBY, Elizabeth M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:5, v. 21, n. 5, p. 280–295, 21 nov. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00820-y>. Acesso em: 11 jun. 2023.

DE NOVA, Pedro J.G. *et al.* In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. *Research in Veterinary Science*, v. 115, n. April, p. 318–324, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.010>.

DECUYPERE, J. A.; DIERICK, N. A. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to in-feed antibiotics in piglets: concept, possibilities and limitations. An overview. *Nutrition Research Reviews*, v. 16, n. 2, p. 193–210, dez. 2003.

DIAO, H. *et al.* Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. *Livestock Science*, v. 167, n. 1, p. 249–256, 2014.

DIAO, H. *et al.* Gastric infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal barrier function in weaned piglets. *Genes and Nutrition*, v. 14, n. 1, 1 fev. 2019.

DIEBOLD, G.; EIDELSBURGER, U. Acidification of diets as an alternative to antibiotic growth promoters. In: BARUG, D *et al.* (Org.). *Antimicrobial growth promoters: Where do we go from here?* 1st. ed. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 311–329.

DRAŠKOVIĆ, Vladimir *et al.* Effects of Phytogetic Feed Additive on Post-Weaned Piglets Naturally Infected With *Brachyspira Hyodysenteriae*. 2019, [S.l: s.n.], 2019. p. 2018–2019.

DUINHOF, T. F. *et al.* Multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* in a Dutch sow herd. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v. 133, n. 14–15, p. 604–608, 2008.

ENNS, Cole B. *et al.* Impairment of electroneutral Na⁺ transport and associated downregulation of NHE3 contributes to the development of diarrhea following in vivo challenge with *Brachyspira* spp. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 318, 2020.

ENNS, Cole B; HARDING, John C S; LOEWEN, Matthew E. Decreased electrogenic anionic secretory response in the porcine colon following in vivo challenge with *Brachyspira* spp. supports an altered mucin environment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 316, p. 495–508, 2019. Disponível em: <<http://www.ajpgi.org>>.

FENG, Yanzhong *et al.* Ulva prolifera Extract Alleviates Intestinal Oxidative Stress via Nrf2 Signaling in Weaned Piglets Challenged With Hydrogen Peroxide. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 30 out. 2020.

FLEMING, Alexander. Penicillin. *Nobel Lecture*, p. 1–11, 1945. Acesso em: 17 ago. 2022.

FOLEY, Timothy D. The Cyclooxygenase Hydroperoxide Product PGG₂ Activates Synaptic Nitric Oxide Synthase: A Possible Antioxidant Response to Membrane Lipid Peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 286, n. 2, p. 235–238, ago. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAOSTATS Food Balances*.

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

FRATINI, Filippo *et al.* In vitro antibacterial activity of manuka (*Leptospermum scoparium* J.R. et G. Forst) and winter savory (*Satureja montana* L.) essential oils and their blends against pathogenic *E. coli* isolates from pigs. *Animals*, v. 10, n. 12, p. 1–8, 1 dez. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7760075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37760075/)>. Acesso em: 12 out. 2021.

GAO, Ruomei *et al.* Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. [S.l.: s.n.], 1998.

GARCÍA-MARTÍN, Ana B. *et al.* Predominance of a macrolide-lincosamide-resistant *Brachyspira hyodysenteriae* of sequence type 196 in Swiss pig herds. *Veterinary Microbiology*, v. 226, n. July, p. 97–102, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.007>>.

GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. *Lipid peroxidation in cell death*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 15 jan. 2017

GEREZ, J. R. *et al.* Effects of chito-oligosaccharide on piglet jejunal explants: An histological approach. *Animal*, v. 13, n. 2, p. 256–261, 1 fev. 2019.

GHOSH, Noyel; CHATTERJEE, Sharmistha; SIL, Parames C. Evolution of antioxidants over times (including current global market and trend). In: NABAVI, SEYED MOHAMMAD; SILVA, ANA SANCHES (Org.). . *Antioxidants Effects in Health*. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 3–32.

GÓMEZ-GARCÍA, Manuel *et al.* Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine Health Management*, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2019.

GREEN, Laura C *et al.* *Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N]Nitrate in Biological Fluids*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [S.l: s.n.], 1982.

HABIG, William H; PABST, Michael J; JAKOBY, William B. Glutathione S-Transferases THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HALAS, D. *et al.* 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, set. 2010.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. In: HALLIWELL, BARRY; GUTTERIDGE, JOHN M. C. (Org.). . *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015. p. 226–229.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M.C. Antioxidant defences synthesized in vivo. In: HALLIWELL, BARRY; GUTTERIDGE, JOHN M. C. (Org.). . *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2015. p. 77–152.

HALLORAN, Katrina; UNDERWOOD, Mark A. Probiotic mechanisms of action. *Early Human Development*, v. 135, p. 58–65, 1 ago. 2019. Acesso em: 18 set. 2023.

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, 1999.

HAMPSON, David J. *et al.* Antimicrobial resistance in *Brachyspira* – An increasing problem for disease control. *Veterinary Microbiology*, v. 229, p. 59–71, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.019>>.

HAMPSON, David J.; BURROUGH, Eric R. Swine Dysentery and Brachyspiral Colitis. In: ZIMMERMAN, JEFFREY J. *et al.* (Org.). . *Diseases of Swine*. 11. ed. [S.l.]: Wiley Blackwell, 2019. p. 951–970.

HENIS, Y; TAGARI, H; VOLCANI, R. Effect of Water Extracts of Carob Pods, Tannic Acid, and Their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms. *Applied microbiology*, v. 12, n. 3, p. 204–9, 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14170956>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1058100>>.

HERBST, W. *et al.* Antimicrobial susceptibility of brachyspira hyodysenteriae determined by a broth microdilution method. *Veterinary Record*, v. 174, n. 15, p. 382, 2014.

HISSIN, Paul J; HILF, Russell. *A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [S.l: s.n.], 1976.

HOWER, Suzanne *et al.* Clonally Related Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Short-Finned Pilot Whales (*Globicephala macrorhynchus*), Human Volunteers, and a Bayfront Cetacean Rehabilitation Facility. *Microbial Ecology* 2013 65:4, v. 65, n. 4, p. 1024–1038, 19 mar. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-013-0178-3>>. Acesso em: 13 jun. 2023.

HULÁNKOVÁ, Radka; BOŘILOVÁ, Gabriela. 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.

HUMPHREY, Sam B. *et al.* Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 2, p. 323–329, 1997.

HYATT, D. R. *et al.* Reduced of virulence *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 6, p. 2244–2248, 1994.

JACOBI, Sheila K. *et al.* Dietary Long-Chain PUFA enhance acute repair of ischemia-injured intestine of suckling pigs. *Journal of Nutrition*, v. 142, n. 7, p. 1266–1271, jul. 2012.

JOERLING, Jessica *et al.* Differential expression of hemolysin genes in weakly and strongly hemolytic *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *BMC Veterinary Research*, v. 16, n. 169, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02385-5>>. Acesso em: 9 maio 2022.

JONASSON, Robert *et al.* Immunological alterations during the clinical and recovery phases of experimental swine dysentery. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 7, p. 845–855, 1 jul. 2006. Disponível em:

<<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46538-0>>.

Acesso em: 9 maio 2021.

KALRA, Ekta K. Nutraceutical - Definition and introduction. *AAPS Journal*, v. 5, n. 3, p. 1–2, 2003.

KARLSSON, Märit *et al.* Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* . *FEMS Microbiology Letters*, v. 172, n. 2, p. 255–260, mar. 1999.

KARLSSON, Märit; OXBERRY, Sophy L.; HAMPSON, David J. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Veterinary Microbiology*, v. 84, n. 1–2, p. 123–133, 2002.

KEITH, Brandon A.; HARDING, John C.S.; LOEWEN, Matthew E. Mutational analysis of TlyA from *Brachyspira hampsonii* reveals two key residues conserved in pathogenic bacteria responsible for oligomerization and hemolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1866, n. 2, p. 130045, 1 fev. 2022. Acesso em: 9 set. 2023.

KIM, Nam Yi; AHN, Sang Gun; KIM, Soo A. Cinnamaldehyde protects human dental pulp cells against oxidative stress through the Nrf2/HO-1-dependent antioxidant response. *European Journal of Pharmacology*, v. 815, n. February, p. 73–79, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.004>>.

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.

KULATHUNGA, D. G. R. S.; HARDING, John C. S.; RUBIN, Joseph E. Antimicrobial susceptibility of western Canadian *Brachyspira* isolates: Development and standardization of an agar dilution susceptibility test method. *PLOS ONE*, v. 18, n. 6, p. e0286594, 30 jun. 2023. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0286594>>. Acesso em: 2 jul. 2023.

KULATHUNGA, D. G.R.S.; RUBIN, J. E. A review of the current state of antimicrobial susceptibility test methods for *Brachyspira*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 63, n. 6, p. 465–474, 2017.

KUTASI, József *et al.* The in vitro effect of garden thyme (*thymus vulgaris* L.) extract on *brachyspira hyodysenteriae*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v. 63, n. 4, p. 467–473, 2016.

LA, Tom *et al.* An atypical weakly haemolytic strain of *Brachyspira hyodysenteriae* is avirulent and can be used to protect pigs from developing swine dysentery. *Veterinary Research*, v. 50, n. 47, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13567-019-0668-5>>. Acesso em: 9 maio 2022.

LA, Tom; PHILLIPS, Nyree D.; HAMPSON, David J. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 7, p. 3372–3375, 2003.

LANAS, Angel. *Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract*. *Arthritis Research and Therapy*. [S.l: s.n.], 17 out. 2008

LAURIDSEN, Charlotte. From oxidative stress to inflammation: Redox balance and immune system. 1 out. 2019, [S.l.]: Oxford University Press, 1 out. 2019. p. 4240–4246.

LIN, Pei Yun *et al.* *Redox and Metabolic Regulation of Intestinal Barrier Function and Associated Disorders*. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI. , 1 nov. 2022

LOW, Chuen Xian *et al.* *Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review*. *Antibiotics*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics10050578>>. , 2021

LUCA, Silvio De *et al.* Transposon-associated lincosamide resistance *Inu(C)* gene identified in *Brachyspira hyodysenteriae* ST83. *Veterinary Microbiology*, v. 214, n. November 2017, p. 51–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.003>>.

LYNCH, H. *et al.* Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 139, p. 50–57, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.008>>.

MAHOMOODALLY, Mohamad Fawzi; L., Daphne Désiré A.; L., Elodie Rosette M. A. Catalase. In: NABAVI, SEYED MOHAMMAD; SILVA, ANA SANCHES (Org.). *Antioxidants Effects in Health The Bright and the Dark Side*. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 81–90.

MAHU, M. *et al.* Presence and mechanisms of acquired antimicrobial resistance in Belgian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates belonging to different clonal complexes. *Veterinary Microbiology*, v. 207, n. May, p. 125–132, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.022>>.

MAHU, Maxime *et al.* Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Veterinary Research*, v. 47, n. 66, 2016. Acesso em: 9 maio 2022.

MAO, Xiangbing *et al.* Benzoic acid used as food and feed additives can regulate gut functions. *BioMed Research International*, v. 2019, 2019.

MARSHALL, Bonnie M.; LEVY, Stuart B. *Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. Clinical Microbiology Reviews*. [S.l: s.n.], out. 2011

MASSACCI, Francesca Romana *et al.* Multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* shedding by pigs during the fattening period. *Veterinary Record*, v. 183, n. 8, p. 264, 2018.

MATSON, Eric G. *et al.* Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 17, p. 5885–5892, set. 2005.

MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 2, p. 1–26, 2018.

MESSIER, Serge; HIGGINS, Robert; MOORE, Camille. Minimal inhibitory concentrations of five antimicrobials against *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 2, n. 4, p. 330–333, 1990.

MEYER, R C; SIMON, J; BYERLY, C S. The etiology of swine dysentery I - Oral inoculation of germ free swine with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli*. *Veterinary Pathology*, v. 11, n. 6, p. 515–526, 1974a.

MEYER, R C; SIMON, J; BYERLY, C S. *The Etiology of Swine Dysentery II - Effect of a Known Microbial Flora, Weaning and Diet on Disease Production in Gnotobiotic and Conventional Swine. Vet. Path.* [S.l: s.n.], 1974b.

MEYER, R C; SIMON, J; BYERLY, C S. *The Etiology of Swine Dysentery III - The Role of Selected Gram-Negative Obligate Anaerobes. Vet. Pathol.* [S.l: s.n.], 1975.

MROZ, Zdzislaw. Organic Acids as Potential Alternatives to Antibiotic Growth Promoters for Pigs. 2005, [S.l: s.n.], 2005. p. 169–182.

MURRAY, Christopher JL *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

MUSHTAQ, Mamoona *et al.* *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: Genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiology*, v. 15, n. 1, 12 out. 2015.

MUURINEN, Johanna *et al.* Swine growth promotion with antibiotics or alternatives can increase antibiotic resistance gene mobility potential. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 5485, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84759-9>>.

NADEEM, Syeda Fatima *et al.* Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 46, n. 5, p. 578–599, 2 set. 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040841X.2020.1813687>>. Acesso em: 4 jun. 2023.

NEIRYNCK, W. *et al.* Efficacy of an autogenous vaccine against *Brachyspira hyodysenteriae*. 2018, Barcelona: [s.n.], 2018. p. 107. Disponível em: <[https://www.ecphm.org/sites/www.ecvdi.org/files/medias/documents/ECPHM/ESPHM 2018 - Proceedings.pdf](https://www.ecphm.org/sites/www.ecvdi.org/files/medias/documents/ECPHM/ESPHM%2018-Proceedings.pdf)>.

NEVES, Saira M.N.; GABARDO, Michelle de P.; GUEDES, Roberto M.C. Hibridização in situ fluorescente para diagnóstico de *Brachyspira hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em suínos. v. 37, n. 10, p. 275–288, 2015.

NOURI, Ali. Encapsulated organic acids as a safe alternative or synergistic compound with anticoccidials for more effective control of coccidiosis in *Eimeria*-challenged broilers. *Livestock Science*, v. 278, 1 dez. 2023.

NOUROOZ-ZADEH, Jaffar; TAJADDINI-SARMADI, Javad; WOLFF, Simon P. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. *Analytical biochemistry*, v. 220, p. 403–409, 1994.

NOVOTNÁ, Markéta; ŠKARDOVÁ, O. *Brachyspira hyodysenteriae*: Detection, identification and antibiotic susceptibility. *Veterinarni Medicina*, v. 47, n. 4, p. 104–109, 2002.

OLSON, Leroy D. Enhanced isolation of *Serpulina hyodysenteriae* by using sliced agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 12, p. 2937–2941, 1996.

OMONIJO, Faith A. *et al.* Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, v. 4, n. 2, p. 126–136, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>>.

PAGE, S. W. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: the benefits. In: BARUG, D. *et al.* (Org.). *Antimicrobial growth promoters*. [S.l.]: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 19–52.

PANDA, Sandeep K. *et al.* *Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes*. *Environmental Research*. [S.l.]: Academic Press Inc., 1 abr. 2016

PARRA-AGUIRRE, Juan *et al.* Experimental natural transmission (seeder pig) models for reproduction of swine dysentery. *PLoS ONE*, v. 17, n. 9, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275173>>. Acesso em: 2 out. 2022.

PARRA-AGUIRRE, Juan C. *et al.* Improving the consistency of experimental swine dysentery inoculation strategies. *Veterinary Research*, v. 54, n. 1, p. 49, 16 jun. 2023. Disponível em: <<https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-023-01180-y>>.

PHAM, Van Hieu *et al.* Effect of blending encapsulated essential oils and organic acids as an antibiotic growth promoter alternative on growth performance and intestinal health in broilers with necrotic enteritis. *Poultry Science*, v. 101, n. 1, 1 jan. 2022.

PIVA, A. *et al.* Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine^{1,2}. *Journal of Animal Science*, v. 85, n. 2, p. 486–493, 1 fev. 2007.

PRÁŠEK, Josef *et al.* Antibiotic susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech swine farms: A 10-year follow-up study. *Acta Veterinaria Brno*, v. 83, n. 1, p. 3–7, 2014.

PRINGLE, Märit *et al.* Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 54, p. 54, 2012.

PRINGLE, Märit *et al.* Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Molecular Microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1295–1306, 2004.

PRINGLE, Märit; FELLSTRÖM, Claes; JOHANSSON, Karl Erik. Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology*, v. 123, n. 1–3, p. 245–248, 2007.

PU, Junning *et al.* Protective Effects of Benzoic Acid, *Bacillus Coagulans*, and Oregano Oil on Intestinal Injury Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Weaned Piglets. *BioMed Research International*, v. 2018, 2018.

QUINTANA-HAYASHI, Macarena P. *et al.* Neutrophil Elastase and Interleukin 17 *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Synergistically with the Pathogen Induce Increased Mucus Transport Speed and. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 8, p. 1–16, 2017.

QUINTANA-HAYASHI, Macarena P. *et al.* The Levels of *Brachyspira hyodysenteriae* binding to porcine colonic mucins differ between individuals, and binding is increased to mucins from

infected pigs with De Novo MUC5AC synthesis. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 4, p. 1610–1619, 2015.

RAHMAN, Md Ramim Tanver; FLISS, Ismail; BIRON, Eric. Insights in the Development and Uses of Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry and Swine Production. *Antibiotics*, v. 11, n. 6, p. 766, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics11060766>>.

RÅSBÄCK, Thérèse *et al.* A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated “*Brachyspira suanatina*” sp. nov. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 983–991, abr. 2007.

RODRIGUES, Leticia Mendonça *et al.* Benzoic acid combined with essential oils can be an alternative to the use of antibiotic growth promoters for piglets challenged with *E. coli* f4. *Animals*, v. 10, n. 11, p. 1–17, 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/animals>.

RUBIN, Joseph E. *et al.* Reproduction of Mucohaemorrhagic Diarrhea and Colitis Indistinguishable from Swine Dysentery following Experimental Inoculation with “*Brachyspira hamptonii*” Strain 30446. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, p. e57146, 27 fev. 2013. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 1 jun. 2021.

RUGGERI, Jessica *et al.* The synergistic effect of organic acids, phytochemicals and a permeabilizing complex reduces *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i-shedding in pigs. *Veterinary Research Communications*, v. 42, n. 3, p. 209–217, 1 set. 2018.

RUWINI, Dharmasiri Gamage. *Improving the diagnostic methods and processes for the identification and characterization of Brachyspira*. 2021a. 208 f. 2021.

RUWINI, Dharmasiri Gamage. *Improving the diagnostic methods and processes for the identification and characterization of Brachyspira*. n. April, p. 208, 2021b.

SAAD, Nizar Y.; MULLER, Christian D.; LOBSTEIN, Annelise. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 28, n. 5, p. 269–279, 2013.

SAEIDNIA, Soodabeh; MANAYI, Azadeh; ABDOLLAHI, Mohammad. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies*, v. 12, n. 4, p. 218–224, 22 jan. 2016.

SATO, José Paulo H. *et al.* Diversity and potential genetic relationships amongst Brazilian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from cases of swine dysentery. *Veterinary Microbiology*, v. 266, p. 109369, 1 mar. 2022. Acesso em: 5 maio 2022.

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.

SCHWARZ, Stefan; CHASLUS-DANCLA, Elisabeth. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, v. 32, n. 3–4, p. 201–225, 2001. Acesso em: 19 set. 2022.

SCHWARZ, Stefan; LOEFFLER, Anette; KADLEC, Kristina. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*, v. 28, n. 1, p. 82-e19, 2017.

SIMONSEN, Gunnar S. *et al.* Transmission of VanA-Type Vancomycin-Resistant Enterococci and vanA Resistance Elements between Chicken and Humans at Avoparcin-Exposed Farms. *Microbial Drug Resistance*, v. 4, n. 4, p. 313–318, 1998.

SMITH, William L.; MARNETT, Lawrence J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1083, n. 1, p. 1–17, abr. 1991.

SORDILLO, Lorraine M.; AITKEN, Stacey L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, n. 1–3, p. 104–109, 15 mar. 2009.

ŠPERLING, D.; SMOLA, J.; ČÍŽEK, A. Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Veterinary Record*, v. 168, n. 8, p. 215, 2011.

STANTON, T. B. Physiology of Runiman and Intestinal Spirochaetes. In: HAMPSON, D. J.; STANTON, T. B. (Org.). . *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. 1. ed. New York: CAB International, 1997. p. 7–46.

STANTON, Thad B. *Glucose Metabolism and NADH Recycling by Treponema hyodysenteriae, the Agent of Swine Dysentery*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. [S.l: s.n.], 1989.

STANTON, Thad B; CORNELL, C Peter. *Erythrocytes as a Source of Essential Lipids for Treponema hyodysenteriae*. *INFECTION AND IMMUNITY*. [S.l: s.n.], 1987.

STANTON, Thaddeus B *et al.* Collateral Effects of Antibiotics: Carbadox and Metronidazole Induce VSH-1 and Facilitate Gene Transfer among *Brachyspira hyodysenteriae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 10, p. 2950–2956, 2008.

STEVANOVIĆ, Zora Dajić *et al.* Essential oils as feed additives—Future perspectives. *Molecules*, v. 23, n. 7, 2018.

STOKSTAD & JUKES, T. H. “-Animal Protein Factor” and Aureomycin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine*, v. 73, n. 3, p. 523–528, 1950.

SUIRYANRAYNA, Mocherla 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, 2015.

SWAMY, Mallappa Kumara; AKHTAR, Mohd Sayeed; SINNIHAH, Uma Rani. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, n. December, 2016.

SWANN, M.M. *et al.* *Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine (Swann Report). Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Report.* London: [s.n.], 1969. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19702204579>>.

TER HUURNE, A. Agnes H.M. *et al.* *Characterization of three putative Serpulina Hyodysenteriae hemolysins. Microbial Pathogenesis.* [S.l: s.n.], 1994

TER HUURNE, Agnes A H M *et al.* Inactivation of a Serpula (Treponema) hyodysenteriae hemolysin gene by homologous recombination: importance of this hemolysin in pathogenesis of *S. hyodysenteriae* in mice. *FEMS Microbiology Letters*, v. 92, 1992.

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. *Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003. Official Journal of the European Union.* European Union: [s.n.], 2003

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. *Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. Official Journal of the European Union.* European Union: [s.n.]. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006&from=EN%0Ahttps://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006&qid=1552299700950&from=EN>>. , 2018

TOLVE, Roberta *et al.* Encapsulation of bioactive compounds for the formulation of functional animal feeds: The biofortification of derivate foods. *Animal Feed Science and Technology*, v. 279, p. 115036, set. 2021.

TSILOYIANNIS, V. K. *et al.* The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, v. 70, n. 3, p. 287–293, 2001a.

TSILOYIANNIS, V. K. *et al.* The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Research in Veterinary Science*, v. 70, n. 3, p. 281–285, 1 jun. 2001b. Acesso em: 8 fev. 2023.

TUGNOLI, Benedetta *et al.* From acidifiers to intestinal health enhancers: How organic acids can improve growth efficiency of pigs. *Animals*, v. 10, n. 134, p. 1–18, 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/animals>.

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.; KETS, E. P.W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 10, p. 4606–4610, 1999. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aem>>. Acesso em: 4 abr. 2023.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. *Bracing for superbugs: strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance*. [S.l.: s.n.], 2023.

UPADHAYA, Santi D.; LEE, Kwang Yong; KIM, In Ho. Effect of protected organic acid blends on growth performance, nutrient digestibility and faecal micro flora in growing pigs. *Journal of Applied Animal Research*, v. 44, n. 1, p. 238–242, 1 jan. 2016.

USA FDA. *Veterinary Feed Directive. Federal Register*. [S.l.: s.n.], 2015

VAN BOECKEL, Thomas P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VAN DEN BOGAARD, Anthony E.; STOBBERINGH, Ellen E. Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, v. 58, n. 4, p. 589–607, 1999.

VANDE MAELE, Lien *et al.* In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to organic acids and essential oil components. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 78, n. 2, p. 325–328, 2016.

VEGA, Clara *et al.* In vitro evaluation of gentamicin activity against Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Porcine Health Management*, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40813-022-00291-w>>.

VENARDOU, Brigkita *et al.* Potential of a fucoidan-rich *Ascophyllum nodosum* extract to reduce *Salmonella* shedding and improve gastrointestinal health in weaned pigs naturally infected with *Salmonella*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

VENKATAKRISHNAN, Vignesh *et al.* *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Regulates Mucin Glycosylation Synthesis Inducing an Increased Expression of Core-2 O-Glycans in Porcine Colon. *Journal of Proteome Research*, v. 16, n. 4, p. 1728–1742, 2017.

VIOTT, A. M. *et al.* The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 145–151, 2013.

WALIA, Kavita *et al.* Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 137, p. 28–35, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.007>>.

WANG, Fang *et al.* Effects of Combined Supplementation of *Macleaya cordata* Extract and Benzoic Acid on the Growth Performance, Immune Responses, Antioxidant Capacity, Intestinal Morphology, and Microbial Composition in Weaned Piglets. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, n. August, p. 1–12, 2021.

WANG, Lixue *et al.* Effects of Three-Layer Encapsulated Tea Tree Oil on Growth Performance, Antioxidant Capacity, and Intestinal Microbiota of Weaned Pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, n. December, p. 1–14, 2021.

WEI, Xiaoyuan *et al.* Dietary organic acids modulate gut microbiota and improve growth performance of nursery pigs. *Microorganisms*, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010110>>.

WELLE, Thijs *et al.* Metabolic response of porcine colon explants to in vitro infection by *Brachyspira hyodysenteriae*: a leap into disease pathophysiology. *Metabolomics*, v. 13, n. 7, p. 1–7, 2017.

WHO. Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark: the WHO international review panel's evaluation of the termination of the use of antimicrobial growth promoters in Denmark. *World Health Organization*, n. November 2002, p. 58, 2003. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/68357>>.

WILCOCK, B. P.; OLANDER, H. J. Studies on the Pathogenesis of Swine Dysentery - I. Characterization of the Lesions in Colons and Colonic Segments Inoculated with Pure Cultures

or Colonic Content Containing *Treponema hyodysenteriae*. *Veterinary Pathology*, v. 16, n. 5, p. 567–573, 1979.

WINDISCH, W *et al.* Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, v. 86, n. 14, p. E140–E148, 2008. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/86/14_suppl/E140[www.journalofanimalscience.org](http://www.journalofanimalscience.org/content/86/14_suppl/E140)Downloadedfrom>. Acesso em: 12 out. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION WESTERN PACIFIC REGION. *Health and Economic Impacts of Antimicrobial Resistance in the Western Pacific Region, 2020-2030*. [S.l.: s.n.], 2023.

XU, Qinglei *et al.* Effects of dietary supplement with a Chinese herbal mixture on growth performance, antioxidant capacity, and gut microbiota in weaned pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, 2022.

YEH, Jih Ching *et al.* Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Brachyspira* Species Isolated in Taiwan. *Microbial Drug Resistance*, v. 24, n. 5, p. 685–692, 2018.

ZENTEK, J. *et al.* Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. [S.l.: s.n.], jun. 2011

ZHAI, H. *et al.* The effects of benzoic acid and essential oils on growth performance, nutrient digestibility, and colonic microbiota in nursery pigs. *Animal Feed Science and Technology*, v. 262, p. 114426, 1 abr. 2020. Acesso em: 18 maio 2021.

ZHAI, Hengxiao *et al.* Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*, v. 4, n. 2, p. 179–186, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>>.

ZHANG, Yue *et al.* Mechanisms and applications of probiotics in prevention and treatment of swine diseases. *Porcine Health Management*. [S.l.]: BioMed Central. Disponível em: <<https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-022-00295-6>>. Acesso em: 1 mar. 2023. , 6 fev. 2023

1

2

3

4

1 Anexo I – Figuras suplementares

2



3

4

Figura Suplementar 1. Cólon espiral sem lesão



1

2 Figura Suplementar 2. Fragmento de cólon espiral apresentando intensa deposição de fibrina e

3 necrose, multifocal a coalescente, com hiperemia multifocal discreta



1

2

Figura Suplementar 3. Fragmento de cólon espiral apresentando mucosa intensamente

3

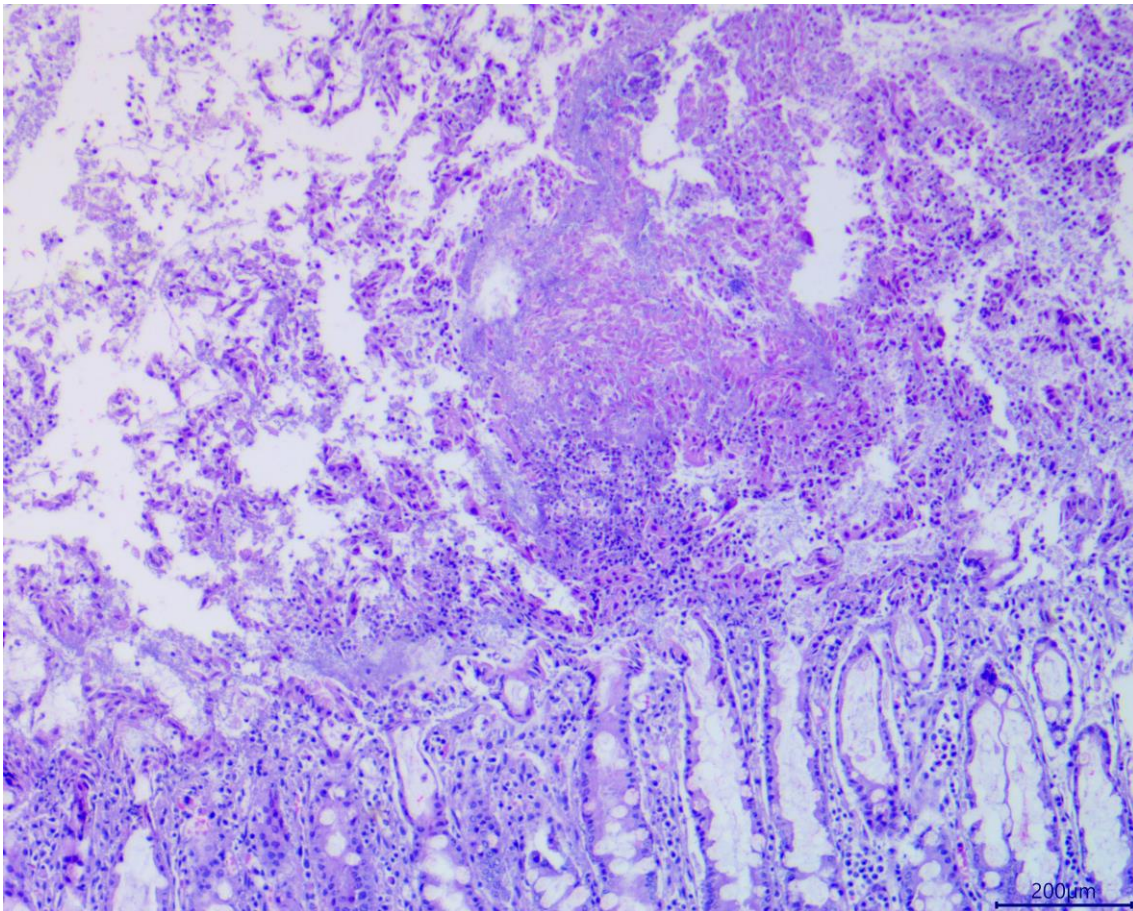
vermelha, difusa associada a edema difuso moderado



1

2

Figura Suplementar 4. Diarreia hemorrágica



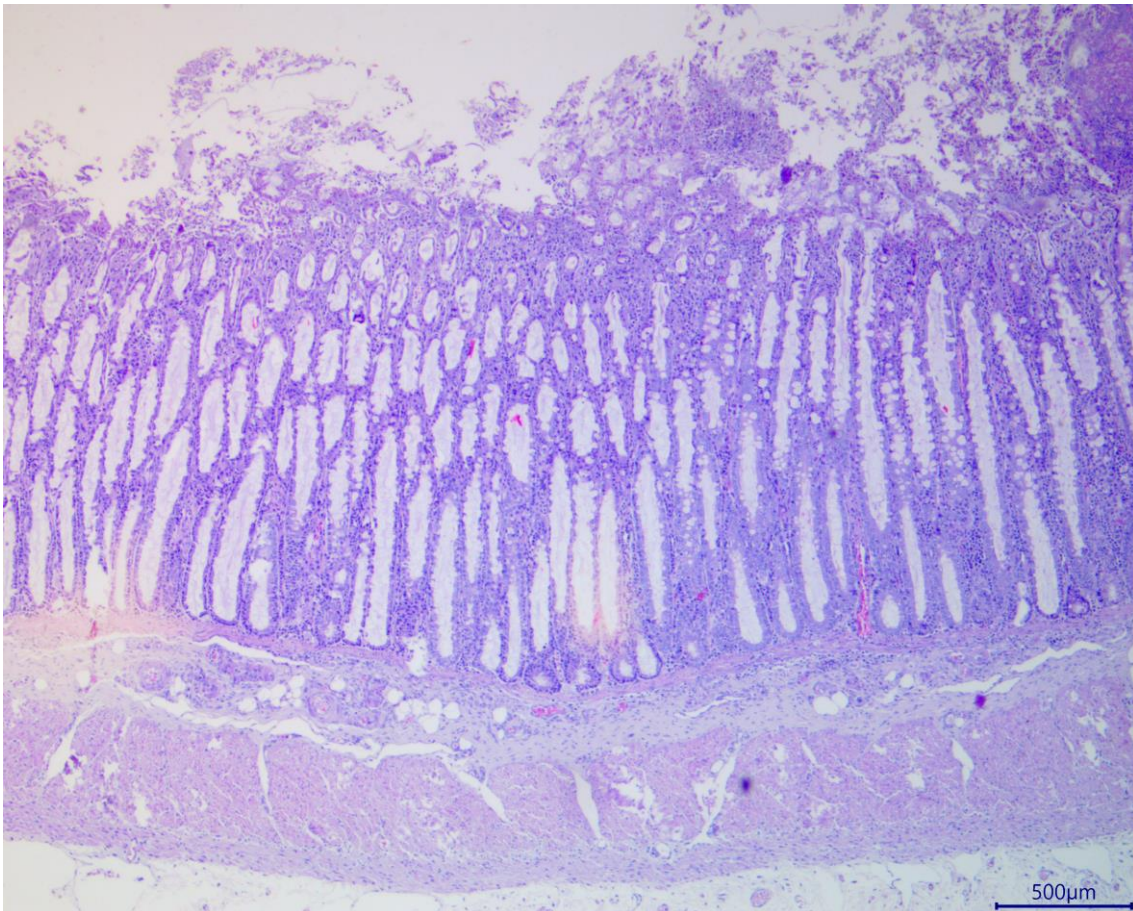
1

2 Figura Suplementar 5. Fotomicrografia de intestino grosso acometido pela Disenteria Suína.

3 Necrose da porção luminal de cripta difusa acentuada associada a hemorragia multifocal

4 moderada e acúmulo de muco multifocal discreto. Hiperplasia de células caliciformes

5 multifocal a coalescente moderado.



1

2 **Figura Suplementar 6. Fotomicrografia de intestino grosso acometido pela disenteria suína.**

3

Hiperplasia de células caliciformes difusa acentuada