

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 11/06/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
Ctx(Ile²¹)-Ha MICROENCAPSULADO PARA SUPLEMEN-
TAÇÃO ORAL EM SUÍNOS COMO NOVO ADITIVO NU-
TRICIONAL

Hanyeny Raiely Leite Silva
Zootecnista

JABOTICABAL - SP
2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
Ctx(Ile²¹)-Ha MICROENCAPSULADO PARA
SUPLEMENTAÇÃO ORAL EM SUÍNOS COMO NOVO
ADITIVO NUTRICIONAL**

Discente: Hanyeny Raiely Leite Silva

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Priscilla Ayleen Bustos Mac-Lean

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia no Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

S586a Silva, Hanyeny Raiely Leite
Avaliação do peptídeo antimicrobiano Ctx (Ile21)-Ha
microencapsulado para suplementação oral em suínos como novo
aditivo nutricional / Hanyeny Raiely Leite Silva. -- Jaboticabal, 2021
72 p. : fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Eduardo Festozo Vicente
Coorientadora: Priscilla Ayleen Bustos Mac-Lean Megna

1. Biotecnologia. 2. Bioquímica. 3. Suínos Criação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Ctx(Ile21)-Ha
MICROENCAPSULADO PARA SUPLEMENTAÇÃO ORAL EM SUÍNOS
COMO NOVO ADITIVO NUTRICIONAL

AUTORA: HANYENY RAIELY LEITE SILVA

ORIENTADOR: EDUARDO FESTOZO VICENTE

COORIENTADORA: PRISCILLA AYLEEN BUSTOS MAC-LEAN MEGNA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã



Prof. Dr. PAULO CESAR POZZA (Participação Virtual)

Departamento de Zootecnia-Universidade Estadual de Maringá-UEM / Maringá/PR



Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD (Participação Virtual)

Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 11 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Hanyeny Raiely Leite Silva, natural de Rio Verde – Goiás, 08 de janeiro de 1996. Graduada em Zootecnia (2019), pelo Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde - GO. Discente do Programa de Iniciação Científica (PIBIC) de 2016 a 2018 pelo grupo de pesquisa Núcleo de Bioensaios e Diversidade de Produtos Naturais - NBDPN. Atualmente é mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agronômicas e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, com ênfase na utilização de Peptídeos Antimicrobianos (PAM) na alimentação de suínos. Também, é membro do grupo de pesquisa Peptídeos: Síntese, Otimização e Estudos Aplicados – PeSEAp e bolsista de Mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2018/25735-7). Publicou um resumo no 1º CIA Pep - Ibero-American Congress on Bioactive Peptides em 2019 e um capítulo de livro intitulado “Peptídeos Antimicrobianos na Produção Animal: Uma Alternativa Biosustentável”, no livro Tecnologias Sustentáveis e agronegócio, editora Associação Amigos da Natureza da Alta Paulista (ANAP), no ano de 2020.

Deus é bom o tempo todo, o tempo todo
Deus é bom.

Dedico este trabalho aos meus pais Flávia e Marcos Antonio, aos meus irmãos Thanyanny Rainy, Thanyewer Raiwer e Hanyewiner Raiewer e a toda minha comissão orientadora.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal pela oportunidade.

Ao professor Dr. Eduardo Festozo Vicente, pela inestimável orientação, confiança, ensinamentos e valiosa oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento de minha bolsa de pesquisa, por meio do processo número 2018/25735-7.

Ao Rodrigo e a toda equipe da granja comercial GRANSUI, por todo apoio e paciência durante a realização da pesquisa.

Ao grupo de pesquisa PeSEAp pelo acolhimento, solidariedade, amizade e colaborações no laboratório.

À professora Dra. Priscilla Ayleen Bustos Mac-Lean, pela coorientação e parceria.

Aos meus pais Marcos Antonio da Silva e Flávia Leite Silva, que sempre foram meus maiores incentivadores, obrigada por todo apoio nos momentos de dificuldades, por todos os valores que me ensinaram, por cada vitória, cada lágrima que compartilharam comigo, por todo amor e carinho. Toda minha gratidão e amor a vocês.

A minha irmã Thanyanny Rainy Leite Silva, e meus irmãos Thanyewer Raiwer Leite Silva e Hanyewiner Raiewer Leite Silva, pela amizade, paciência, pelas palavras de incentivo, obrigada por sempre estarem ao meu lado. Amo vocês.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e me incentivaram, em especial a Carollynne Martins, obrigada por todo apoio e amizade.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Diarreia em suínos	20
2.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	22
2.3 Microencapsulação	24
2.4. Aplicação de PAMs na nutrição de suínos	26
3 OBJETIVO GERAL	27
4 OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)	28
5.2 Microencapsulação	30
5.3 Caracterização das micropartículas com o peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha	32
5.4 Experimentos <i>in vivo</i> de aplicação das microcápsulas em leitões	34
5.4.1 Remediação: avaliação preliminar	35
5.4.2 Experimento Profilático e Terapêutico	37
5.5 Análise estatística	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1 Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)	40
6.2 Microencapsulação	41
6.3 Caracterização das micropartículas com peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha	43
6.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
6.3.2. Difração de Raios X (DRX)	44
6.3.3 Análises térmicas	45
6.3.4. Análises do FTIR/FTRaman.....	48
6.4 Experimentos <i>in vivo</i> de aplicação das microcápsulas em leitões	50
6.4.1 Remediação: avaliação preliminar	50
6.4.2 Profilático e Terapêutico	54
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE I.....	70
APÊNDICE II	72

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Síntese e aplicação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha e seus respectivos conjugados em diferentes formulações como aditivo nutricional em suínos" (Synthesis and application of antimicrobial peptide Ctx (Ile²¹) -Ha and their conjugates in different formulations as nutritional additive in swine), registrada com o nº 04/2019 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Eduardo Festozo Vicente** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências e Engenharia da UNESP - Câmpus de Tupã, em reunião de **19/09/2019**.

Tupã, 20 de setembro de 2019.



Prof. Dr. Diogo de Lucca Sartori
Presidente da Comissão de Ética em Uso de Animais

Expediente CEUA nº 04/2019

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/12/2019 a 28/02/2020
Espécie/Linhagem/Raça	suínos / comercial / não definida
Número de Animais	60
Peso/Idade	01 kg / até 21 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Granja comercial

AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Ctx(Ile²¹)-Ha MICROENCAPSULADO PARA SUPLEMENTAÇÃO ORAL EM SUÍNOS COMO NOVO ADITIVO NUTRICIONAL

RESUMO - A suinocultura mundial vem crescendo e solidificando-se progressivamente nos últimos anos. Assim, diante da crescente exigência do consumidor em um produto de maior qualidade e saudável, a execução e aplicação de novas tecnologias tem se tornado cada vez mais interessantes. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) representam uma ótima alternativa para substituir os aditivos antimicrobianos comerciais. Diante disso, o objetivo deste trabalho sintetizar e aplicar o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha em formulações para atuação como aditivo nutricional oral em leitões na fase de maternidade, durante os primeiros 21 dias de vida. Para isto, a síntese, purificação e caracterização do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi realizada, obtendo a molécula com alto teor de pureza e massa suficiente para os estudos *in vivo*. A seguir, o peptídeo foi formulado via microencapsulação por gelificação ionotrópica e revestido com ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP), resistente ao pH estomacal. As microencapsulações foram caracterizadas por métodos físico-químicos e demonstraram que o peptídeo foi incorporado adequadamente na formulação. A avaliação do peptídeo *in vivo* foi dividida em dois experimentos: a “Remediação”, realizada em 10 animais como avaliação preliminar, onde foram aplicadas, em duas etapas, as micropartículas contendo o peptídeo em leitões já acometidos por diarreia e o “Profilático/Terapêutico”, no qual foram aplicadas duas doses diferentes em dois tratamentos (PEP1 e PEP2, este último recebendo o dobro da dose do primeiro), além do grupo controle (sem peptídeo). Todos os animais tiveram acesso a ração no *creep feeding* até o dia imediatamente anterior ao desmame ($n_{\text{total}} = 136$). Os dados de escores fecais para os experimentos Remediação e Profilático/Terapêutico foram submetidos à análise de correspondência e foram calculados para cada animal, de ambos os experimentos, o número de dias para cessar a diarreia e o número de dias em cada classe de escore fecal. Ambas foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA) e, independentemente da análise, $P_{\text{valor}} \leq 0,05$ foi considerado como significativo. Não foram constatados efeitos significativos nos experimentos de Remediação em nenhuma variável analisada. Entretanto, no experimento Profilático e Terapêutico, o ganho de peso médio diário do tratamento PEP1 (0,214 kg/dia) apresentou um aumento de 18 g/dia em relação ao tratamento CRTL (0,196 g/dia) e 9 g/dia a mais em relação ao tratamento PEP2 (0,205 kg/dia) durante os 21 dias da fase de maternidade ($P_{\text{valor}} < 0,0001$). O peso a desmama no tratamento PEP1 (6,01 kg) (menor dose de peptídeo) foi significativo ($P_{\text{valor}} \leq 0,05$), apontando um aumento final médio de 0,30 g por animal em relação ao tratamento CRTL (5,71 kg) e um valor de massa de 0,19 g maior em relação ao tratamento PEP2 (5,82 kg). Porém, para a presença de diarreia, escore fecal e o número de dias para aparecimento e cessão da diarreia, para ambos os experimentos, não houve diferença significativa ($P_{\text{valor}} > 0,05$), observado também para a variável de GPD do experimento de Remediação. Como conclusão, o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha pode ser considerado um interessante substituto dos antibióticos comerciais para a aplicação em suínos, pois apresentou um desempenho similar que os promotores de crescimento comerciais utilizados.

Palavras-chaves: Aditivos. Leito fluidizado. Leitões lactantes. Microencapsulação. Peptídeos antimicrobianos.

EVALUATION OF Ctx(Ile²¹)-Ha MICROEN-CAPSULATED ANTIMICROBIAL PEPTIDE FOR ORAL SUPPLEMENTATION IN SWINE AS A NEW NUTRITIONAL ADDITIVE

ABSTRACT - The world's swine industry has been growing and solidifying progressively in recent years. Thus, given the growing consumer demand for a higher quality and healthier product, the execution and application of new technologies has become increasingly interesting. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) represent an excellent alternative to replace commercial antimicrobial additives. Therefore, the objective of this work is to synthesize and apply the antimicrobial peptide Ctx(Ile²¹)-Ha in formulations to act as an oral nutritional additive in piglets in the maternity phase, during the first 21 days of life. For this, the synthesis, purification and characterization of the antimicrobial peptide Ctx(Ile²¹)-Ha was performed, obtaining the molecule with high purity content and sufficient mass for in vivo studies. Then, the peptide was formulated via microencapsulation by ionotropic gelation and coated with hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP), resistant to stomach pH. The microencapsulations were characterized by physicochemical methods and demonstrated that the peptide was adequately incorporated into the formulation. The evaluation of the peptide in vivo was divided into two experiments: the "Remediation", carried out in 10 animals as a preliminary evaluation, where the microparticles containing the peptide were applied in two stages to piglets already affected by diarrhea and the "Prophylactic /Therapeutic", in which two different doses were applied in two treatments (PEP1 and PEP2, the latter receiving double the dose of the first), in addition to the control group (without peptide). All animals had access to ration in creep feeding until the day immediately before weaning (total = 136). The fecal score data for the Remediation and Prophylactic/Therapeutic experiments were submitted to correspondence analysis and the number of days to stop diarrhea and the number of days in each class of fecal score were calculated for each animal in both experiments. Both were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and, regardless of the analysis, P-value ≤ 0.05 was considered significant. No significant effects were found in the Remediation experiments in any of the analyzed variables. However, in the Prophylactic and Therapeutic experiment, the average daily weight gain of the PEP1 treatment (0.214 kg/day) showed an increase of 18 g/day compared to the CTRL treatment (0.196 g/day) and 9 g/day more in relation to the PEP2 treatment (0.205 kg/day) during the 21 days of the maternity phase (Pvalue < 0.0001). Weaning weight in the PEP1 treatment (6.01 kg) (lower dose of peptide) was significant (Pvalue ≤ 0.05), indicating a final mean increase of 0.30 g per animal in relation to the CTRL treatment (5.71 kg) and a mass value of 0.19 g higher in relation to the PEP2 treatment (5.82 kg). However, for the presence of diarrhea, fecal score and the number of days for diarrhea onset and cessation, for both experiments, there was no significant difference (Pvalue > 0.05), also observed for the experiment's GPD variable of Remediation. In conclusion, the antimicrobial peptide Ctx(Ile²¹)-Ha can be considered an interesting substitute for commercial antibiotics for application in swine, as it presented a similar performance as the commercial growth promoters used.

Keywords: Additives. Fluidized bed. Lactating piglets. Microencapsulation. Anti-microbial peptides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da síntese do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha em fase sólida	29
Figura 2. Processo de microencapsulação do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha com bomba peristáltica por meio de gelificação ionotrópica	31
Figura 3. Processo de revestimento das micropartículas do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile ²¹)-Ha, através de leito fluidizado	32
Figura 4. Processo de revestimento das amostras com carbono para a realização das análises de MEV	33
Figura 5. Equipamento de FTIR/FT-Raman, para caracterização das micropartículas.	34
Figura 6. Perfil cromatográfico do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha bruto, com 94% de pureza	41
Figura 7. Espectro de massas do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha bruto, evidenciado a adequada obtenção do peptídeo.....	41
Figura 8. Micropartículas do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha após o processo de revestimento, apresentando as duas formulações obtidas para aplicação em suínos, as micropartículas H1 e H2.....	42
Figura 9. Micrografias do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile ²¹)-Ha encapsulado	44
Figura 10. Perfis de DRX do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha microencapsulado.	45
Figura 11. Análise termogravimétrica por TGA (azul)/dTGA (marrom)/DSC (rosa) das micropartículas contendo o peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha.....	47
Figura 12. Caracterização das micropartículas por calorimetria diferencial de varredura (DSC).	47
Figura 13. Espectro Raman das amostras microencapsuladas do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha, H1 e H2.	49
Figura 14. Resultados de FTIR nas amostras microencapsuladas do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha, H1 e H2, no material de revestimento HPMCP, no peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha	50
Figura 15. Escore fecal dos animais dos experimentos de Remediação	51
Figura 16. Ganho de peso médio diário dos leitões dos experimentos de Remediação: avaliação preliminar	51
Figura 17. Variação de ganho de peso médio diário dos leitões dos experimentos de Remediação: avaliação preliminar	52
Figura 18. Número de dias em cada escore fecal dos leitões dos experimentos de remediação.....	53
Figura 19. Número de dias para cessar a diarreia dos leitões nos experimentos de remediação.....	53
Figura 20. Incidência de diarreia nos tratamentos.....	55
Figura 21. Número de dias para começar a diarreia.	55
Figura 22. Ganho médio de peso diário (GPD) dos leitões durante a fase de maternidade.	56
Figura 23. Peso a desmama dos leitões (21 dias).....	58
Figura 24. Peso a desmama dos animais que receberam tratamento terapêutico.	58
Figura 25. Número de dias em cada escore fecal.	59
Figura 26. Número de dias para cessar a diarreia.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Métodos de encapsulamento e suas vantagens.....	26
--	----

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor e quarto exportador de carne suína do mundo, produzindo 3,98 mil toneladas e exportando 750 mil toneladas, respectivamente, além de possuir um consumo interno de 15,3 kg por habitante no ano de 2019 (ABPA, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a indústria de alimentos e o setor de produção animal deixe de utilizar antibióticos sintéticos em animais saudáveis, como finalidade de prevenção de doenças e como promotores de crescimento, assim diminuindo o uso rotineiro destes antibióticos. Frente a isso, a OMS instituiu diretrizes com o objetivo de vetar o uso desencadeado de antibióticos na cadeia produtiva de animais (OMS, 2017).

Devido à grande exigência do consumidor por um produto mais saudável e uma maior preocupação com a segurança alimentar, a cadeia produtiva de suínos vem sofrendo grandes restrições e mudanças. A produção em grande escala tem visado produtos mais saudáveis que atendam às exigências do mercado consumidor interno e externo.

O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou a portaria Nº 1, de janeiro de 2020, que proíbe em todo território nacional, a importação, fabricação e o uso de aditivos que tem por finalidade a promoção do melhoramento do desempenho animal que contenham tilosina, lincomicina e tiamulina (MAPA, 2020). Neste contexto, o foco no desenvolvimento de pesquisas de novas alternativas para a substituição dos antimicrobianos comerciais por moléculas naturais, com atividade igual ou superior aos antibióticos convencionais, tem aumentado nas últimas décadas (Magana et al., 2020).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são interessantes alternativas para o desenvolvimento de produtos naturais para substituição dos antibióticos convencionais. Estas moléculas têm características multivalentes, além de possibilitar a própria modificação química para a otimização de seus efeitos (Sierra e Viñas, 2021). Os PAMs são expressos naturalmente pelo hospedeiro para eliminar os patógenos invasores e aumentar a resposta imune. As atividades benéficas destas moléculas são determinadas por meio de suas propriedades físicas: estrutura primária curta (até 50 aminoácidos), catiônicos (carga líquida, em média, de +3) e um conteúdo hidrofóbico médio de 42% (Mishra et al., 2017).

Diante disso, o grupo de pesquisa “Peptídeos: Síntese, Otimização e Estudos Aplicados – PeSEAp” (FCE/Unesp Campus de Tupã) vem estudando extensivamente o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, que é uma molécula natural com atividade antimicrobiana e antifúngica (Vicente et al., 2013), a qual tem se mostrado muito promissora para uma possível aplicação na alimentação animal e, especificamente neste trabalho, na nutrição de suínos.

chia coli (ETEC) e seu desenvolvimento é ocasionado por bactérias que se aderem à mucosa do intestino, produzindo enterotoxinas, dentre elas as toxinas termolábeis (Lt) e as termoestáveis (Sta e Stb). Estas provocam a evolução de diarreia e desidratação do animal que, em casos mais severos, podem levar o animal a óbito. Já as variedades de adesinas mais frequentemente correlacionados com a diarreia são K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6) e F41 (Dean-Nystrom et al. 1997, Bertschinger & Fairbrother 1999).

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a síntese peptídica em fase sólida foi muito eficiente para a obtenção do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, resultando numa molécula bruta com teor de pureza de 94%, e assim sendo possível a continuidade dos estudos *in vivo*. A espectrometria de massas permitiu a caracterização e a confirmação da obtenção do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha.

As microencapsulações peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, foram robustas e eficientes no objetivo de incorporar o peptídeo nos revestimentos a base de celulose proposto (HPMCP), habilitando o uso de uma massa menor de peptídeo para aplicação nos animais. As micropartículas foram confirmadas e ratificadas por meio das caracterizações das micropartículas realizadas por diversas técnicas físico-químicas.

Os experimentos *in vivo* apresentaram resultados satisfatórios sobre o desempenho zootécnico dos suínos para o GPD e peso a desmama do experimento Profilático, ambos para do tratamento PEP1, obtendo incremento significativo de ganho de peso diário e final, além de exercer atividade similar aos antibióticos convencionais, quando foi necessário para cessar a diarreia. Porém, é preciso a realização de estudos mais profundos a fim de analisar a ação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha no trato gastrointestinal dos suínos. Como realizamos os estudos numa granja comercial, o abate dos animais ficou comprometido.

Portanto, em face dos resultados que foram apresentados, o peptídeo Ctx(Ile²¹) pode ser considerado um potencial substituto para antibióticos convencionais, atuando de forma similar no desempenho zootécnico dos animais em relação aos antibióticos já utilizados.

REFERÊNCIAS

Abbas S, Da Wei C, Hayat K, Xiaoming Z (2012) Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review. **Food Reviews International** 28: 343 – 374. DOI: [10.1080/87559129.2011.635390](https://doi.org/10.1080/87559129.2011.635390)

ABPA 2020: Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2020. Brasil. Disponível em: <http://abpa-br.org/relatorios/>. Acesso em: 11 fev. 2020.

Aliaga AE, Osorio-Román I, Leyton P, Garrido C, Carcamo J, Caniulef C, Campos-Vallette MM (2009). Surface-enhanced Raman scattering study of L-tryptophan. **Journal of Raman Spectroscopy** 40:164-169. DOI: [10.1002/jrs.2099](https://doi.org/10.1002/jrs.2099)

Al-obaid H, Buckton G (2009) Evaluation of griseofulvin binary and ternary solid dispersions with HPMCAS. **AAPS PharmSciTech**, 10:1172, 2009. DOI: [10.1208/s12249-009-9319-x](https://doi.org/10.1208/s12249-009-9319-x)

Anbinder PS, Deladino L, Navarro ASDR, Amalvy J, Martino MN (2011). Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**. 1:80-87 DOI: [10.4236/jeas.2011.14011](https://doi.org/10.4236/jeas.2011.14011) .

Andrushchenko VV, Vogel HJ, Prenner EJ (2006). Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1758: 1596-1608. DOI: [10.1016/j.bbamem.2006.07.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.013)

Auvynet C, Rosenstein Y (2009) Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. **The FEBS Journal** 276:6497 – 6508. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x).

Baccaro M, Moreno A, Corrêa A, Ferreira A, Calderaro F. (2002). Resistência antimicrobiana de amostras de Escherichia coli isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**. 69:15-18.

Balgon MJ, Ahmed GAR, Qusti SY (2018) FT-Raman study of protein mistfolding and renaturation in brain hippocampus. **Neurology, Psychiatry and Brain Research** 30:101-109. DOI: [10.1016/j.npbr.2018.08.001](https://doi.org/10.1016/j.npbr.2018.08.001)

Bansode SS, Barnajee SK, Gaikwaid DD, Jadhav SL, Thorat RM (2010) Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. 1:38-43.

Barros DS, Júnior JGC, Corrêa VS, Abreu JG, Fraga AL, Mainardi F, Dutra V (2008) Efeito da adição de probiótico e prebiótico sobre o ganho de peso, consumo de ração e ocorrência de diarreia em leitões na fase de aleitamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 9: 469-479.

Bertschinger HU, Fairbrother JM (1999) *Escherichia coli* infections. In: Straw B.E., D'allaire S., Mengeling W.L. & Taylor, D.J. (ed.) **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames. p.431-468

Ciobanu CI, Stefanescu R, Niculaua M, Teslaru T, Gradinaru R e Drochioiu G (2016) Mass Spectrometric Evidence for Iron Binding to the Neuroprotective Peptide NAP and its Cys5 Mutant. **European Journal of Mass Spectrometry**. 2:97-104. DOI: doi.org/10.1255/ejms.1414

Chan WC, White P (Eds) (1999) **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. Oxford, 370p.

Colombo FC (2014) **Dispersões sólidas mucoadesivas para administração oral de zidovudina**. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia - Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas –Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

Costa MM, Silva MS, Spricigo DA, Witt NM, Marchioro SB, Kolling L, Vargas APC (2006). Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 26:5-8.

Costa SS, Machado BAS, Martin AR, Bagnara F, Ragadalli SA, Alves ARC (2015). Drying by spray drying in the food industry: Microencapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, 9:462-470.

Cutler AS, Lonergan SM, Cornick, NA, Johnson A, Stahl CH (2007) Dietary Inclusion of Colicin E1 Is Effective in Preventing Postweaning Diarrhea Caused by F18-Positive *Escherichia coli* in Pigs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51:3830-3835. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00360-07>

DA Silva AL (2013). **Caracterização Mineralógica por Difração de Raios X e Determinação de Terras Raras por ICP-MS de Rochas da Região Sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) Universidade Federal de Minas Gerais

Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, 71:126-134. DOI: [10.1016/j.carbpol.2007.05.030](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.030)

Dean-Nystrom EA, Burkhardt D, Bosworth BT, Welter MW (1997). Presence of F18ac (2134 P) fimbriae on 4 P-*E. coli* isolates from weaned pigs with diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. 9:77-79.

Denari GB, Cavalheiro ETG (2012). **Princípio e aplicações de análise térmica. Material de apoio**. Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos.

Desai KGH, Park HJ (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, 22:179-192. DOI: [10.1080/02652040400026533](https://doi.org/10.1080/02652040400026533)

Dias VHR (2007). **Produção de granulados em leite fluidizado de acordo com uma concepção experimental**. Lisboa, Dissertação (Mestrado em Farmacotecnica Avançada). Universidade de Lisboa.

Dutra DR (2011). **Prebiótico e probiótico para leitões experimentalmente desafiados com *Escherichia coli* K88+**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal de Lavras.

Etchepare MA et al (2015) Microencapsulação de probióticos usando alginato de sódio. **Ciência Rural**. 45: 1319-1326. DOI: [10.1590/0103-8478cr20140938](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140938).

Galleti SR (2003). Introdução a Microscopia Eletrônica. **Instituto Biológico**. 65,1-2:33-35.

Guaní-guerra, E. et al. (2010) Peptídeos antimicrobianos: Visão geral e implicações clínicas na saúde e doenças humanas. **Imunologia Clínica**. 153:1-11.

Gouin S (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, 15, 7-8: 330-347

Guaní-guerra, E. et al. (2010) Peptídeos antimicrobianos: Visão geral e implicações clínicas na saúde e doenças humanas. **Imunologia Clínica**. 153:1-11.

Gyles CL, Fairbrother JM (2010) *Escherichia coli*, p.231-265. In: Gyles C.A., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds), **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Wiley-Blackwell, Iowa.

Huang Y, Huang J, Chen Y. (2010) Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein Cell**. 1: 143–52. DOI: 10.1007/s13238-010-0004-3

Huyghebaer G (2003) **Replacement of antibiotics in poultry**. In EASTERN NUTRITION CONFERENCE, 2003, Quebec CITY. Anais. Quebec City. 1:1-23

Hu W, Yang Y, Li z, Wang F, Wang Y (2020) Antibacterial, Cytotoxicity and Mechanism of the Antimicrobial Peptide KR- 32 in Weaning Piglets. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. 26:943- 953. DOI: [10.1007/s10989-019-09898-0](https://doi.org/10.1007/s10989-019-09898-0)

Johansen M, Alban L, Kjaersgård HD, Baekbo P (2004) Factors associated with suckling piglet average daily gain. **Preventive Veterinary Medicine**. 63:91-102. DOI: [10.1016/j.prevetmed.2004.01.011](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.01.011).

Jørgensen JN, Laguna JS, Millán C, Casabuena O, Gracia MI (2016) Effects of a Bacillus based probiotic and dietary energy content on the performance and

nutrient digestibility of wean to finish pigs. **Animal Feed Science and Technology**. 221:54-61. DOI: doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.008

Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, 8, 1.

Kummer R, Gonçalves MAD, Lippke RT, Passos BMF, Prado M, Tiago JM (2009). Factors associated with nursery pig performance. **Acta Scientiae Veterinariae**. 37: 195-209

Kiefer C, Rizzardi R., Oliveira, B. F, Silva CM, Martins LP, Fantini CC (2012) Complexo homeopático na prevenção e tratamento de diarreias em leitões lactentes. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 13:74-82.

Lê S, Josse J, Husson F (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**. 25:1-18.

Lenth R (2019) Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.

Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**. 37:207-15. DOI: doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001

Lim GP, Ahmad MS (2017). Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 56, 382-393. DOI: doi.org/10.1016/j.jiec.2017.07.035

Liu G et al (2016) Macleaya cordata Extract Decreased Diarrhea Score and Enhanced Intestinal Barrier Function in Growing Piglets. **Biomed Research International**. DOI: doi.org/10.1155/2016/1069585

Lopes CM, Lobo JMS, Costa P (2005) Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêutica**. 41:114- 154. DOI: doi.org/10.1590/S1516-93322005000200003

Macêdo NR, Menezes CPL, Lage AP, Ristow LE, Reis A, Guedes RMC (2007). Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 59(5): 1117-1123.

Machado A, Liria CW, Proti PB, Remuzgo C, Miranda TM (2004) Sínteses Química e Enzimática de Peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações. **Química Nova**. 27:781-789. DOI: doi.org/10.1590/S0100-40422004000500018

Machado GB, Fortes TP, Dewes C, Neto ACPS, Vasconcellos FA, Timm CD, Lima HG, Silva EF (2020) Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of

Salmonella isolates recovered from pig slaughter. **Brazilian Journal of Development**. 6:8. DOI:10.34117/bjdv6n8-017

MADENE, A. et al (2006). Flavor encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 41,1:1-21.

Magana M, Pushpanathan M et al (2020) The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **Lancet Infectious Diseases**. 20:216-230. DOI: [10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3).

Marques LG. et al (2006). Freeze-drying characteristics of tropical fruits. **Drying Technology**, 24, 4: 457-463.

Menezes CR, Barin JS, Chicowski AJ, Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Fries LLM, Terra NN (2013) Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**. 43:1309-1316, 2013. DOI: [10.1590/S0103-84782013005000084](https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000084)

Menin A, Reck C, Souza D, Klein C, Vaz E. (2008) Agentes bacterianos enteropatógenos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**. 38: 1687-1693. DOI: [10.1590/S0103-84782008000600030](https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600030).

MAPA 2020: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa (IN) nº 1, 13 de janeiro de 2020**. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-norma-tiva-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

Mishra B et al (2017) Peptídeos antimicrobianos de defesa do hospedeiro como antibióticos: estratégias de design e aplicação. **Opinião Atual em Biologia Química**. 38:87-96.

OMS 2017: Organização Mundial da Saúde. **Diretrizes da OMS sobre o uso de antimicrobianos medicamente importantes em animais produtores de alimentos**. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/en/. Acesso em: 20 fevereiro 2021.

Ozkan G, Franco P, Marco I, Xiao J, Capanoglu E (2019) A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**. 272: 494-506. DOI: [10.1016/j.foodchem.2018.07.205](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205)

Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2020). **nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3.1-150, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.

R Core Team (2020). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rathore S. et al (2013). Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, 116, 2:369-381,

Ross GR et al (2010). Effects of prebiotic administration in swine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, 109, 6:545-549.

Rodrigues AG, Galzerani JC (2012). Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. 34(4).

Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC (2009) **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press. p. 279-559.

Seyfi R, Kahaki FA, Ebrahimi T, Montazersaheb S, Eyvazi S, Babaeipour V, Tarhriz V (2019) Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. 26: 1451-1463. DOI: [10.1007/s10989-019-09946-9](https://doi.org/10.1007/s10989-019-09946-9)

Sierra JM, Miguel VM (2021) Future prospects for Antimicrobial peptide development: peptidomimetics and antimicrobial combinations. **Expert Opinion on Drug Discovery**. DOI: [10.1080/17460441.2021.1892072](https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1892072)

SOBESTIANSKY J, BARCELLOS D (1998). Uso de antimicrobianos em suinocultura. Goiânia: Art 3 **Impressos Especiais**, 103 p.

Tang X, Fatufe AA, Yin Y (2012) Dietary Supplementation with Recombinant Lactoferrampin-Lactoferricin Improves Growth Performance and Affects Serum Parameters in Piglets. **Journal of Animal Veterinary Advances**. 11:2548–2555. DOI: [10.3923/javaa.2012.2548.2555](https://doi.org/10.3923/javaa.2012.2548.2555)

Utiyama CE, Oetting LL, Giani PA, Ruiz US, Miyada VS. (2006). Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35(6). DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000800023>

Vicente EF, Basso, LGM, Cespedes GF, Lorenzón EN, Castro MS, Mendes-Giannini MJS, Costa-Filho AJ, Cilli EM (2013) Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile²¹)-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **PloS one**. 8: 608-618.

Wang Y, Shan T, Xu Z, Feng J, Wang Z (2007) Effects of the lactoferrin (LF) on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology** 135:263-272. DOI: doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.07.013

Wang, J, Dou, X, Song, J, et al (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Medicinal Research Reviews** 39: 831– 859. <https://doi.org/10.1002/med.21542>

Warnes GR, Bolker B, Lumley T, Johnson RC (2018) gmodels: Various R Programming Tools for Model Fitting. <https://cran.r-project.org/web/packages/gmodels/index.html>

Woranuch S, Yoksan R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, 96:578-585. DOI: doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.117

Wu S, Zhang F, Huang Z, Liu H, Xie C, Zhang J, Thacker PA, Qiao S (2012) Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. **Peptides**. 35:225-230. DOI: [10.1016/j.peptides.2012.03.030](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.030)

Xiao H, Shao F, Wu M, Ren W, Xiong X, Tan B, Yin Y (2015) The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. 6: 1-6. DOI: [10.1186/s40104-015-0018-z](https://doi.org/10.1186/s40104-015-0018-z)

Xiong X et al. (2014) Effects of antimicrobial peptides in nursery diets on growth performance of pigs reared on five different farms. **Livestock Science**. 167:206-210

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. **Trends in Immunology**. 23:291–296. DOI: [10.1016/s1471-4906\(02\)02246-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02246-9)

Yi, H., Zhang, L., Gan, Z., Xiong, H., Yu, C., Du, H., & Wang, Y. (2016). High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine. **Scientific Reports**, 6, 25679. DOI: [10.1038/srep25679](https://doi.org/10.1038/srep25679)

Yoon, JH, Ingale SL, Kim JS, Kim KH, Lee SH, Park YK, Kwon IK, Chae BJ (2012) Effects of dietary supplementation of antimicrobial peptide-A3 on growth performance, nutrient digestibility, intestinal and fecal microflora and intestinal morphology in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**. 177:98-107. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2012.06.009](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.06.009)

Yoon JH, Ingale SL, Kim JS, Kim KW, Lohakare J, Park YK, Park JC, Kwon IK, Chae BJ (2012) Effects of dietary supplementation with antimicrobial peptide-P5 on growth performance, apparent total tract digestibility, faecal and intestinal microflora and intestinal morphology of weanling pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 93:587-592. DOI: [10.1002/jsfa.5840](https://doi.org/10.1002/jsfa.5840)

Yoon JH, Ingale SL, JS Kim JS, Kim KH, Lee SH, Park YK, Lee SC, Kwon IK, Chae BJ (2014). Effects of dietary supplementation of synthetic antimicrobial peptide-A3 and P5 on growth performance, apparent total tract digestibility of nutrients, fecal and intestinal microflora and intestinal morphology in weanling pigs. **Livestock Science**, 159: 53-60.

Yu HT, Ding XL, Li N, Zhang XY, Zeng XF, Wang S, Liu HB, Wang YM, Jia HM, Qiao SY (2017). Dietary supplemented antimicrobial peptide microcin J25 improves the growth performance, apparent total tract digestibility, fecal microbiota, and intestinal barrier function of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, 95,11: 5064–5076

Zaiou M (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. **Journal of Molecular Medicine**. 85:317–329. DOI: [10.1007/s00109-006-0143-4](https://doi.org/10.1007/s00109-006-0143-4)

Zaworska-Zakrzewska A, Potocka-Kasprowicz M, Mikula R, Taciak M, Pruszyńska-Oszmalek E, Frankiewicz A (2020) Growth Performance, Gut Environment and Physiology of the Gastrointestinal Tract in Weaned Piglets Fed a Diet Supplemented with Raw and Fermented Narrow-Leafed Lupine Seeds. **Animals**.10:2084. DOI:[10.3390 / ani10112084](https://doi.org/10.3390/ani10112084).

Zeineldin M, Aldridge B, James L (2019). Antimicrobial Effects on Swine Gastrointestinal Microbiota and Their Accompanying Antibiotic Resistome. **Frontiers in Microbiology**

Zhang L, Kosaraju SL (2007) Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**. 43: 2956-2966. DOI: [10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033)

Zhang LG, Allo RL (2016) Antimicrobial peptides. **Current Biology**. 26:14-19. DOI: [10.1016/j.it.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003)

Zhao PY, Kim IH (2015) Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**. 200: 86 92. DOI: doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.010