

**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(IIe21)-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 CIAPep - 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 ($n_{total} = 136$). 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, $P_{valor} \leq 0,05$ 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 ($P_{valor} < 0,0001$). O peso a desmama no tratamento PEP1 (6,01 kg) (menor dose de peptídeo) foi significativo ($P_{valor} \leq 0,05$), 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 ($P_{valor} > 0,05$), 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. Leite fluidizado. Leite lactante. 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 a 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 timulina (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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diarreia em suínos

Ao nascer, os leitões são considerados *germ free*, ou seja, sem contaminação de microrganismos, sendo que esta contaminação ocorre no momento do nascimento. O trato gastrointestinal desses animais deixa de ser estéril e em pouco tempo é colonizado por *Lactobacillus* e *bacteroides*, o que compreende a maior parte da microbiota normal de um suíno em aleitamento. O restante da microbiota corresponde a microrganismos anaeróbios facultativos (*Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.) e uma pequena parte é compreendida por microrganismos transitório como *Clostridium*, *Staphylococcus* (Huyghebaert et al., 2003) e *Salmonella spp* (Menin et al., 2008).

Fatores fisiológicos e ambientais exercem papéis de grande importância na estabilização da microbiota intestinal dos leitões. O pH alto do estômago, logo após ao nascimento, deve-se à secreção insuficiente de ácido clorídrico, o que favorece que bactérias tolerantes ao pH elevado desenvolvam-se em diferentes partes do trato intestinal (Barros et al., 2008).

Dentre as enfermidades entéricas, a colibacilose apresenta grande impacto na indústria suinícola. É causada por cepas enterotoxigênicas de *Escherichia 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).

Leitões recém-nascidos podem ser contaminados pela ETEC por meio da ingestão, particularmente presente na glândula mamária ou teto da porca. Alguns fatores como o baixo índice de higiene e uma desinfecção inadequada das baias favorecem o aumento de *E. coli* patogênicas no meio ambiente (Gyles e Fairbrother, 2010).

Os fármacos antimicrobianos convencionas para o controle e profilaxia de enfermidades ocasionadas por bactérias patogênicas em suínos são frequentemente utilizados (Costa et al., 2006). Entretanto, o uso desses fármacos apresenta benefícios na cadeia de produção, devido a sua ação melhoradora do desempenho dos animais, reduzindo o custo de produção, uma vez que é difícil a manutenção do ambiente livre de patógenos.

No entanto, esta prática está trazendo sérios riscos à saúde pública, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, resultando em seleção de bactérias resistentes e, também associado à presença de resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal (Machado et al., 2020).

Em estudos realizados por Costa et al. (2006) com 40 isolados clínicos de suínos com diarreia e 13 isolados ambientais, 82,5% dos isolados clínicos foram positivos para pelo menos um tipo de gene pesquisado de *E. coli*, os quais eram Stb, Sta, Lt, Stx, F18, F4, F5, F41 e F6. Os genes para toxinas com maior frequência foram do tipo Stb, presentes em 50% dos isolados, seguidos de Sta e Lt, com 35%. Os genes de adesinas com maior frequência foram F18, com 27,5%, seguido por F4 e F5 com 22,5%. Os autores também analisaram a resistência a agentes antimicrobianos como ampicilina, cefalexina, enrofloxacina, colistina, norfloxacina, fluorfenicol, amicacina, cloranfenicol, trimetoprim, neomicina, tetraciclina, sulfazotrim (sulfametoxazol + trimetoprim) e gentamicina, do qual 98,1% de todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados.

Os autores citados anteriormente relataram ainda que a única amostra com sensibilidade a todos os antimicrobianos foi isolada da ração ofertada aos animais. O maior índice de sensibilidade foi observado para fluorfenicol em 81,1% dos isolados, seguido de norfloxacina com 79,2% e enrofloxacina, com 75,4%. A maior resistência foi observada para tetraciclina em 88,6% dos isolados, seguida por sulfazotrim, com 73,5% e por trimetoprim, com 66%. Desta forma, o estudo concluiu que o uso desordenado de antibióticos eleva o índice

de resistência dessas bactérias e diminui, conseqüentemente, o efeito dos antibióticos comerciais (Costa et al., 2006). Diante deste cenário, o desenvolvimento e a pesquisa por novas moléculas naturais e eficazes para o aumento da produtividade em suínos, sem causar resistência bacteriana e rastros metabólicos no animal é urgentemente demandado.

2.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Os PAMs são moléculas que possuem várias funções, apresentando um largo espectro de potencial contra principalmente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, (YANMEI LI et al., 2012), além de vírus, fungos e parasitas (Seyfi et al., 2020). Essas moléculas foram reconhecidas pela primeira vez na década de 1990, devido a infecção bacteriana ou fúngica por *Drosophila melanogaster*, pois as defensinas em *Drosophila* eram similares às β -defensinas humanas e, assim, apontaram a sua atividade antimicrobiana (Magana et al., 2020).

O sistema imunológico dos organismos multicelulares é integrado por uma gama de mecanismos para proteção do hospedeiro contra frequentes interações com microrganismos patogênicos (Guaní-guerra et al., 2010). Os PAMs são moléculas que possuem vasta atividade biológica e fazem parte da imunidade inata da maioria dos seres vivos. Esses peptídeos apresentam normalmente de 10 a 50 aminoácidos carregados positivamente, como arginina, lisina e a histidina, que proporciona ambientes básicos (cationicidade), além de possuir aproximadamente 50% de aminoácidos hidrofóbicos (Huang et al., 2010). Estes PAMs possuem quatro tipos de estruturas, sendo elas as alfa-hélices, folhas-beta, alças (dobras ou *turns*) e formas desordenadas (Seyfi et al., 2020).

Os PAMs podem ser categorizados de diversas formas, baseando-se em suas estruturas, sequências e mecanismo de ação (Kumar et al., 2018). Estas moléculas podem ter uma gama de atividades, como por exemplo a antimicrobiana, imunomoduladora (a qual está ligada diretamente no controle de doenças infecciosas e inflamatórias), anticancerígena e antiviral (Guaní-guerra et al., 2010). Estas atividades biológicas dependerão da estrutura e da sequência dos PAMs (Kumar et al., 2018).

Basicamente, a eficiência dos PAMs em eliminar bactérias está relacionada com a sua eficácia de interação com as membranas bacterianas ou paredes celulares. Como já mencionado, na maioria das vezes, os PAMs possuem

uma carga líquida positiva e uma grande proporção de aminoácidos hidrofóbicos, fazendo com que eles se liguem seletivamente a membranas bacterianas negativamente carregadas, levando assim à ruptura não enzimática da membrana bacteriana (Zhang, 2016).

Devido à crescente resistência e desenvolvimento de cepas patogênicas frente a antibióticos padrões, tem-se buscado o desenvolvimento e emprego de fármacos naturais advindos dos PAMs, tanto pelas companhias farmacêuticas quanto pela indústria de nutrição animal (Magana et al., 2020). Assim, diante desta situação, estas moléculas geraram um enorme interesse em pesquisas científicas. Porém, devido ao fato da dificuldade de isolamento dos PAMs em grandes quantidades para sua aplicabilidade, fez-se necessário a síntese dessas moléculas para estudos mais aprimorados e específicos. Desse modo, por meio da síntese química (a mais utilizada), síntese enzimática ou biocatálise, dentre outras técnicas, é possível desenvolver peptídeos aprimorados para fins específicos (Machado et al., 2004), como a atuação destes em forma de aditivos na nutrição de animais de produção.

O uso de antibióticos comerciais em grande escala na nutrição suína pode ocasionar grandes riscos à saúde pública e ao meio ambiente (Kiefer et al., 2012), devido à elevada resistência desenvolvida pelas bactérias-alvo e aos resíduos metabólicos deixados por estas moléculas. No intuito de aplicar PAMs na nutrição animal, Yoon et al. (2012) analisaram o peptídeo A3 (AMP-A3), com potencial antimicrobiano, aplicado à nutrição de leitões desmamados. Este peptídeo antimicrobiano exerceu efeitos positivos, aumentando o crescimento destes animais e atuando também na morfologia e microflora intestinal de uma forma benéfica.

Em um estudo *in vivo* realizado por Hu et al. (2019), foi relatado que a utilização do PAM KR32, injetados de forma intraperitoneal em suínos, atuou de forma positiva em leitões durante o desmame, diminuindo quadros de diarreia dos animais que receberam a aplicação do PAM KR32 em relação aos animais que receberam a aplicação de uma solução salina.

Desta forma, em busca de novas moléculas e estudos com PAMs, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, contém 21 resíduos de aminoácidos e foi isolado da rã *Hypsiboas albopunctatus* (Vicente et al., 2013). A molécula possui uma estrutura anfipática, e tem um grande potencial antimicrobiano contra fungos e bactérias

Gram-positivos e Gram-negativos. Assim, o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi escolhido por ser um interessante e promissor candidato para substituir os antibióticos convencionais, comumente utilizado na produção de suínos.

2.3 Microencapsulação

Micropartículas podem variar de 1 a 1000 µm e sua forma física é caracterizada pelo formato esférico e sólido. Essas micropartículas podem ser usadas para transportar e proteger diversos compostos como, por exemplo, moléculas peptídicas (Bansode et al., 2010).

A tecnologia da microencapsulação é utilizada em inúmeras indústrias, como a agrícola, alimentar, médica e cosmética. As aplicações desta tecnologia são muito variadas, principalmente na indústria farmacêutica, como a de mascarar sabores ou odores; conversão de líquidos em sólidos; proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor e/ou oxidação); redução da volatilidade; melhoramento das características de escoamento de pós; facilitação do manuseio de substâncias tóxicas; auxílio à dispersão de substâncias insolúveis em água em meios aquosos e produção de formas farmacêuticas de liberação controlada, sustentada e vetorizada (Abbas et al., 2012)

Devido à alta degradação enzimática das proteínas que ocorre no trato gastrointestinal, principalmente no estômago, a administração oral de peptídeos sofre algumas limitações. Sendo assim, é necessário a utilização de estratégias para uma proteção e otimização vantajosa para a utilização e ação destas macromoléculas. Assim, o processo de microencapsulação pode proporcionar uma alta biodisponibilidade da proteína/peptídeo, promover estabilidade e proteção à molécula e permitir sua liberação controlada no intestino, como é o caso do estudo referente a esta dissertação. É fundamental a escolha de um método de microencapsulação simples, de fácil reprodutividade, rápido e exequível em escala industrial; mas, acima de tudo, deve minimizar a perda da atividade biológica do peptídeo ou da proteína ativa a ser encapsulada (Menezes, 2013).

A gelificação inotrópica é uma técnica de microencapsulação que se baseia na capacidade de reticulação de polieletrólitos na presença de íons multivalentes, como Ca²⁺, Ba²⁺ e Al³⁺. Pode ser aplicada por qualquer extrusão ou emul-

sificação/gelificação, sendo que a extrusão é o método mais utilizado para produzir partículas esféricas de gel, realizando um gotejamento em uma solução aquosa de CaCl_2 (Ozkan et al., 2019).

Polímeros naturais vêm sendo muito empregados no processo de microencapsulação. Um polímero natural que vem mostrando muito potencial em sistemas de liberação controlado é o alginato (Costa et al., 2015). Este polímero é linear, possuindo uma alta massa molar (Menezes et al., 2013) e é composto por uma mistura de ácidos poliurônicos contendo resíduos de ácido D-manurônico e L-gulurônico (Rowe et al., 2009). O alginato tem sido bastante utilizado devido a sua capacidade de absorção de água, fácil manuseio e inocuidade, além de outras características físico-químicas importantes, como a gelificação (Etchepare et al., 2015).

Na técnica de revestimento em microencapsulação por meio de leito fluidizado, as partículas sólidas do fármaco ficam suspensas por meio de uma corrente quente de ar, e assim são revestidas por meio da nebulização da solução de revestimento. A estrutura do leito fluidizado permite que ocorra uma recirculação das partículas, permitindo assim que quando as partículas chegam ao topo sejam lançadas novamente para baixo para serem revestidas e secas. Este processo é contínuo para obtenção de uma espessura adequada de revestimento (Dias, 2007). Por meio desta técnica de revestimento, é possível a obtenção de um revestimento mais uniforme.

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) é um polímero celulósico utilizado para liberação controlada de fármacos, o qual possui uma capacidade de intumescimento que tem efeito direto na cinética de liberação do fármaco incorporado (Lopes et al., 2005). O HPMCP é bastante empregado na indústria farmacêutica em formulações orais, devido ao seu potencial de proteção, impedindo que os fármacos ocasionem efeitos secundários no estômago, uma vez que o HPMCP não é afetado pelo pH do estômago, sendo assim dissolvido apenas no intestino com o pH 7,5 (Colombo, 2014). O HPMCP também pode ser utilizado para mascarar os sabores indesejáveis de fármacos, podendo ser aplicado sozinho ou em associação com outro agente formador de filmes (Rowe et al., 2009). Existem vários outros métodos de encapsulamento e alguns deles são abordados na Tabela 1.

Quadro 1. Métodos de encapsulamento e suas vantagens.

Métodos de encapsulamento	Vantagens	Desvantagens	Referências
<i>Spray drying</i>	Disponibilidade de equipamentos, ampla variedade de agentes encapsulantes, produção potencialmente em larga escala, boa eficiência e baixo custo de processo	Produção de materiais de tamanhos não uniformes	Madene et al., 2006
<i>Spray cooling</i>	A tecnologia de encapsulamento mais barata por empregar temperaturas mais baixas e com alto potencial de aumento de escala	Baixa capacidade de encapsulamento e a expulsão do núcleo durante o armazenamento	Rathore et al., 2013
Extrusão	Vida útil muito longa dos compostos aromatizantes	Partículas grandes	Gouin, 2004
Liofilização	Produtos de excelente qualidade, pois minimiza as alterações associadas à alta temperatura	Alto custo e longo tempo de processo	Marques et al., 2006
Leito fluidizado	Obtenção de um revestimento mais uniforme.	Utilização de uma quantidade significativa de substância a encapsular	Dias, 2007

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4. Aplicação de PAMs na nutrição de suínos

Os problemas intestinais têm um grande impacto na cadeia de produtiva de suínos, pois afetam negativamente e diretamente o desempenho zootécnico do animal, aumentando o custo de produção devido a utilização de medicamentos. Atualmente, o uso desordenado de antimicrobianos sintéticos para o controle de diarreia em suínos tem acarretado o aparecimento de cepas resistentes e, conseqüentemente, a diminuição da eficiência destes antibióticos contra estas cepas (Baccaro et al., 2002). Segundo Menin (2008), considerada como cepa resistente, a patogenicidade da *Escherichia coli* está relacionada com sua capacidade de colonizar o intestino, através de fímbrias, estruturas proteicas que são consideradas antígenos de superfície com alta atividade antigênica.

A *E. coli* é o agente bacteriano que mais ocasiona diarreia em suínos nas diferentes fases de criação. Os sorotipos fimbriais mais prevalentes na fase de maternidade são F5/K99 (20% de incidência), F6/987P (16,3%), F42 (6,8%) e

F41 (5,7%). Além disso, em uma pesquisa de Macedo et al. (2007), de 144 amostras analisadas, 29,2% foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência testados (K88, K99, 987P, F18 e F41).

Diante disso, estratégias de manejo e novas alternativas são necessárias para reduzir as consequências causadas pela alta taxa de resistência antimicrobiana, sobretudo quando é necessária a aplicação de antimicrobianos no controle de infecções (Zeineneldin et al., 2019). Nesse contexto, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha surge como uma alternativa aos antimicrobianos convencionais, já que ele possui vasta atividade biológica contra bactérias e fungos (Vicente et al., 2013).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a viabilidade da aplicação oral do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, formulado e microencapsulado, na alimentação de suínos, especificamente em leitões na maternidade, como um novo e eficiente aditivo nutricional natural.

4 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Como objetivos específicos deste trabalho, realizou-se a síntese, purificação e caracterização do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha e a formulação/microencapsulação desta molécula peptídica. Após isto, realizou-se a sua caracterização físico-química para averiguar as propriedades químicas e físicas das microcápsulas. Após as caracterizações, realizou-se os experimentos *in vivo* com leitões na fase de maternidade até o desmame, com 21 dias de idade, avaliando as variáveis de aparecimento ou não de diarreia nos animais, ganho médio de peso diário (GPD), peso a desmama, escore fecal e o número de dias para aparecimento e cessão da diarreia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)

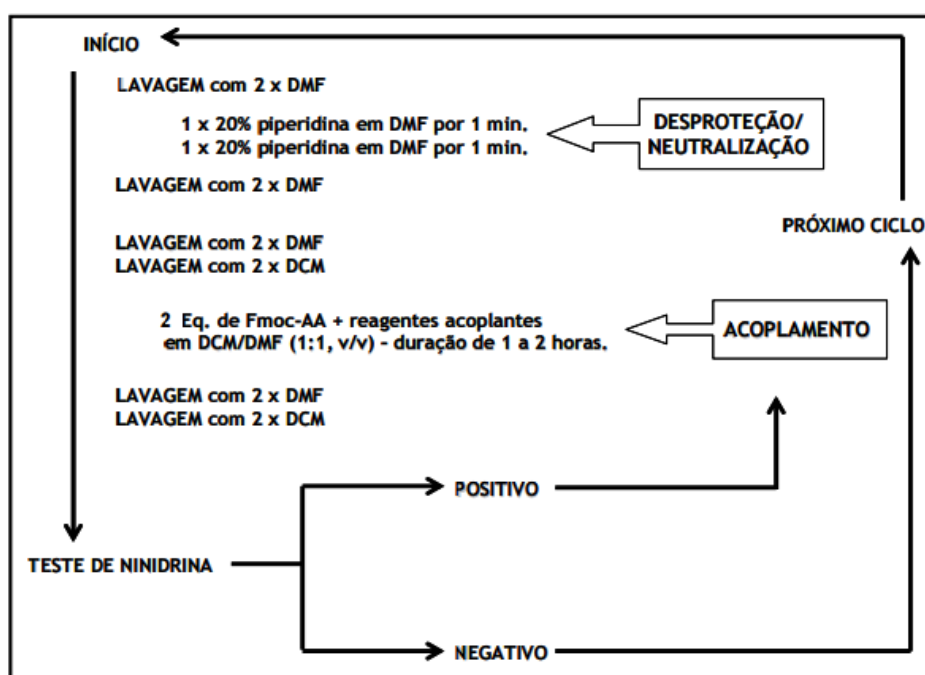
A síntese peptídica do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi realizada no Laboratório de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências e Engenharia (FCE/Unesp), Campus de Tupã. Esta síntese foi feita por meio do método da Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS), empregando a química Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) a qual é o grupo protetor α -amínico dos aminoácidos utilizados nesta técnica (Chan e White, 1999). A resina Rink Amide foi utilizada como polímero ou resina de suporte, com grau de substituição de 0,67 mmol/g, escala de 0,4 mmol e excesso de três vezes, resultando em um equivalente de reagentes (aminoácidos e agentes acoplantes) de 1,2 mmol por cada reação. Foram utilizadas seringas descartáveis com filtro poroso que asseguraram no descarte de subprodutos e excedentes de reagentes.

Nas reações de acoplamentos, utilizou-se prioritariamente Fmoc-aminoácidos padrões e os agentes acoplantes: *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt), em agitação por duas horas. Para eliminação dos excedentes de reagente, foram aplicados, a cada passo, ciclos de duas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM). A retirada do grupo protetor amino (Fmoc) foi realizada por meio da adição de uma solução de 4-metilpiperidina 20% em DMF durante um minuto e posteriormente por 20 minutos (Figura 1).

Após o acoplamento de todos os aminoácidos da cadeia peptídica do Ctx(Ile²¹)-Ha, foi realizada a clivagem por meio da adição de solução composta de água deionizada, triisopropilsilano (TIS) e ácido trifluoracético (TFA), nas respectivas proporções 2,5:2,5:95 (v,v,v), em um frasco de cintilação de 20 mL de volume, por um período de duas horas, sob agitação branda com barra magnética. Em seguida o complexo peptídeo-resina foi precipitado utilizando éter gelado, e realizou-se a separação das fases por meio de três ciclos de centrifugação por cinco minutos com rotação de 3.600 rpm, sendo o sobrenadante retirado e armazenado em um frasco de vidro como precaução, caso o peptídeo tenha alta hidrofobicidade e esteja presente na fase etérea.

A extração do peptídeo foi efetuada na fase sólida da separação, que continha resina e peptídeo bruto, por meio do acréscimo de água deionizada acidificada com 0,045% de TFA (solução A) e acetonitrila acidificada com 0,036% de TFA (solução B) na proporção de 1:1 (v:v), seguido de centrifugação por cinco minutos a 3.600 rpm. O sobrenadante peptídeo bruto foi liofilizado, resultando em um pó floculoso e branco, que é o material de interesse da síntese.

Figura 1. Etapas da síntese do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha em fase sólida.



Fonte: Vicente, 2009.

Posteriormente, para a realização do processo de purificação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, foi efetuada a análise do perfil cromatográfico desta molécula e avaliação do seu teor de pureza por meio do sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), marca Shimadzu, modelo Prominence, localizado no Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Faculdade de Ciências e Engenharia (FCE/Unesp), Campus de Tupã. Em seguida, o peptídeo foi devidamente identificado e caracterizado via Espectrometria de Massas, para a confirmação da obtenção do mesmo.

5.2 Microencapsulação

A microencapsulação do peptídeo foi realizada em laboratório na Universidade de Araraquara-UNIARA. Foi utilizado o processo de gelificação ionotrópica, utilizando o alginato (ALG) como polímero, devido sua capacidade de formação de gel na presença de íons multivalentes. A princípio, foi realizada uma dispersão de alginato a 2% em 500 mL de água destilada. Esta dispersão procedeu sob constante agitação com barra magnética até a homogeneização completa do alginato, formando um líquido de textura de gel. Em seguida, foi adicionado o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, com massas iniciais de 100 mg e 200 mg (aqui denominados de H1 e H2, respectivamente), separadamente em frascos reacionais, sob contínua agitação com barra magnética, por cerca de uma hora. Posteriormente, foi preparada para cada amostra uma solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5% em água destilada e mantida sob refrigeração.

Logo após o período de uma hora, a dispersão aquosa do alginato incorporada com diferentes quantidades do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha em massa foi gotejada numa solução reticulante de cloreto de alumínio a 5% por meio de uma bomba injetora. Este procedimento foi mantido em banho de gelo durante todo o experimento. Logo depois do contato com a solução reticulante, a gota de alginato com peptídeo incorporado solidifica, originando assim as micropartículas, as quais foram mantidas a todo momento sob agitação magnética a 720 rpm por 60 minutos, para total solidificação (Figura 2). Após esta etapa, as micropartículas foram separadas por filtração e secadas a 40°C por 24 horas em estufa com circulação de ar forçada.

Figura 2. Processo de microencapsulação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha com bomba peristáltica por meio de gelificação ionotrópica.



Fonte: Arquivo próprio.

Após a secagem, as micropartículas foram submetidas a um revestimento com uma dispersão filmógena de ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) a 10%, que foi obtida por meio de uma solução de 20 g de HPMCP, 50 g de hidróxido de amônio, 5 g de trietilcitrate e 125 g e água purificada. Esta solução foi dispersada sobre as partículas através de uma bomba peristáltica da marca LabMiq, modelo MLF 100, com temperatura de 50°C, soprador inicial de 0,10 m³/min, sendo aumentado gradativamente, de acordo com que as micropartículas fossem ficando mais pesadas; vibração de 100% e bomba peristáltica a 0,4 mL/min. Este processo foi realizado por duas vezes seguidas para garantia de total revestimento das partículas (Figura 3).

Figura 3. Processo de revestimento das micropartículas do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, através de leito fluidizado.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Foi avaliada também a dosagem incorporada de peptídeo nas micropartículas. Para isso, a micropartícula foi totalmente dissolvida em tampão fosfato com pH 7,0 e, através do espectrofotômetro ajustado no comprimento de onda em 280 nm, foi realizada a quantificação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha compreendido em cada micropartícula. Utilizou-se a lei de Lambert-Beer para quantificação do peptídeo (Equação 1):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot \ell \quad (\text{Equação 1})$$

onde **A** é a absorvância adquirida no comprimento de onda em 280 nm, ε é o coeficiente de absorvidade molar do triptofano ($5.690 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ℓ é o caminho ótico utilizado nas medidas e **c** é a concentração molar (mol L^{-1}).

5.3 Caracterização das micropartículas com o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha

A caracterização das micropartículas de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi realizada em parceria com o Instituto de Química – Unesp, Campus de Araraquara e com a Faculdade de Ciências e Tecnologia – Unesp, Campus de Presidente Prudente.

As amostras de micropartículas H1 e H2 contendo o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foram caracterizadas por meio de técnicas físico-químicas, como microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e FTIR/FTRaman. As análises de microscopia de varredura das micropartículas foram realizadas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEG JEOL JSM 7500F. As amostras foram inicialmente revestidas com carbono (Figura 4) e depois visualizadas a 2,0 kV. A corrente de emissão usada foi de 10 μ A, sonda de corrente de 9, distância de trabalho de 6,5 mm, modo de imagem eletrônica secundária e ampliação de até 30.000x (Deladino et al.,2008).

Figura 4. Processo de revestimento das amostras com carbono para a realização das análises de MEV.



Fonte: Arquivo próprio.

O equipamento usado nas análises de DRX foi um difratômetro modelo XRD-6000, Shimadzu, Japão. As amostras foram analisadas a 35 kV e 20 mA de radiação Cu-K α , em uma faixa angular de 2° a 50° (2 θ) com taxa de varredura de 2° min⁻¹.

As análises termogravimétricas e de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em um equipamento de modelo DST Q600 V20.9 Build 20 e analisadas no software TA INSTRUMENTS. Para cada amostra, utilizou-se um cadinho de alumínio, uma atmosfera de nitrogênio com temperatura inicial de 20°C e final de 300°C, com uma taxa de 10°C min⁻¹. Para a quantificação das micropartículas, foi utilizado um equipamento FTIR/FTRaman da marca Bruker,

com laser de 1.064 nm, potência máxima de 200 mW e detector de Ge na faixa de 4000-400 cm^{-1} (Figura 5).

Figura 5. Equipamento de FTIR/FTRaman, para caracterização das micropartículas.



Fonte: Arquivo próprio.

5.4 Experimentos *in vivo* de aplicação das microcápsulas em leitões

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, registrado com o número de protocolo 04/2019 da CEUA/FCE/Unesp Tupã, sendo os cuidados padrões com o uso dos animais baseados no Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA).

Esta etapa do trabalho *in vivo* foi dividida em dois experimentos, denominados de Remediação: avaliação preliminar, que consistiu na aplicação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado, via oral, em animais na fase de maternidade a partir da detecção de diarreia em animais com menos de 12 dias de idade, por um período de 10 dias consecutivos, sendo este uma avaliação preliminar, para avaliação do potencial do peptídeo em cessar a diarreia.

O outro experimento, aqui denominado Profilático e Terapêutico, teve por objetivo a profilaxia contra bactérias Gram negativas dos animais em fase de maternidade, até o desmame. Para isto, os animais foram divididos em três tratamentos, sendo eles o grupo controle (CTRL), o tratamento 1 (PEP1) e o tratamento 2 (PEP2), onde nos tratamentos PEP1 e PEP2 os leitões receberam diferentes doses do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado via oral, uma vez por dia (PEP2 recebeu o dobro da dose de PEP1). No grupo controle, os leitões não receberam doses do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado. Todos os animais

receberam ração no *creep feeding* e estavam alojados na mesma sala de maternidade, nas mesmas condições ambientais. Estes ensaios foram realizados na granja comercial GRANSUI, localizada no distrito de Parnaso, município de Tupã, estado de São Paulo.

5.4.1 Remediação: avaliação preliminar

Os experimentos de Remediação foram realizados em duas etapas, com duração de 10 dias cada uma, em épocas diferentes, executados como experimentos piloto. Para sua execução, foram utilizados dez leitões ($n = 10$) em cada etapa, a partir do momento que apresentaram sintomas claros de diarreia (fezes líquidas amareladas). Desse modo, na primeira etapa da Remediação, os animais foram tratados diariamente, cada um, com três microcápsulas do tipo H2, totalizando uma massa aproximada de 69,6 μg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha (para os cálculos, ver seção 5.2 dos Resultados e Discussão) denominado aqui de PEP1, via oral, sendo os leitões pesados todos os dias.

Teoricamente, para que haja um efeito terapêutico na diminuição das populações de bactérias Gram negativas que colonizam o intestino do leitão em maternidade, é necessário que haja uma quantidade de peptídeo maior que a sua concentração inibitória mínima (CIM) para esta bactéria, o qual é de 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 0,0035 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Vicente et al., 2013). Deste modo, ao se considerar um peso médio de um leitão no nascimento, que é de 1,4 kg e assumindo sua densidade de 1 g L^{-1} , tem-se que seriam necessários pelo menos 0,005 μg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para serem liberados no intestino. Assim, considerando que durante todo o processo de aplicação houve muitas perdas por diversos fatores (degradação do peptídeo, possível desnaturação do peptídeo em pH ácido, microencapsulações incompletas etc.) e por ser um experimento piloto, assumiu-se uma quantidade maior (aproximadamente 14.000 vezes) que a dose terapêutica calculada.

De modo que, logo após o desmame, o leitão ainda está em fase de desenvolvimento, de maneira que vários fatores de estresse podem ocasionar efeitos negativos sobre o seu desempenho (Kumer et al., 2009). Sendo assim, foi necessária a realização da segunda etapa do experimento de Remediação, devido à observação de que os animais da primeira etapa apresentaram uma certa

apatia, denominada de animais “refugos”, o que pode ocasionar um retardo no desenvolvimento desses animais na fase seguinte de suas vidas. Desta forma, esta segunda etapa teve como objetivo avaliar se o excesso de manejo poderia estar prejudicando o comportamento desses animais e se a dose de peptídeo antimicrobiano foi abaixo da terapêutica para a diarreia. Desta forma, na segunda etapa, os animais receberam diariamente, via oral, seis micropartículas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha e foram pesados a cada três dias. Além disso, para a compilação dos resultados, foi verificada visualmente a reação dos leitões ao longo do tempo, onde o momento zero, ou seja, o início do experimento, foi estipulado quando se verificou a presença visual de diarreia individualmente. Além disso, a avaliação foi realizada pela mesma pesquisadora, todos os dias, sempre no mesmo horário.

O grau de severidade foi analisado segundo a definição de escore fecal. Este parâmetro de comparação foi designado por meio da seguinte escala: “escore fecal 0” foi classificado para fezes normais; “escore fecal 1” para fezes muito pastosas e amareladas e “escore fecal 2” para fezes líquidas e amareladas (Sobestiansky et al., 1998).

Em estudo realizado por Menin et al. (2008), 76% dos leitões em maternidade que apresentaram diarreia estavam acometidos pela bactéria *E. coli*. Desta forma, a eficácia do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi avaliada por meio de teste de hipótese, assumindo que o número de leitões com diarreia contaminados com *E. coli* segue uma distribuição binomial, onde se assume, por hipótese nula (H₀), que a proporção de leitões acometidos por diarreia tendo como o patógeno *E. coli* é de 76% (H₀: P = 76%). Já a hipótese alternativa (H₁) afirma que esta proporção seria menor em função do uso do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha que será utilizado na Remediação (H₁: P < 76%). Isto implica que, em função da distribuição binomial, numa amostra de tamanho 10 (n = 10; P = 0,76), pode-se refutar o H₀ caso houver no mínimo seis leitões protegidos (isentos de diarreia), isto é, até quatro leitões ainda apresentando o quadro de diarreia.

Visto que o equilíbrio da flora intestinal atua de forma direta e benéfica no desempenho dos leitões, um desses efeitos benéficos seria a criação de uma barreira que atrapalha a colonização do trato gastrointestinal por bactérias pato-

gênicas exógenas, aumentando a altura das vilosidades do intestino e, consequentemente, aumentando a área de superfície de absorção de nutrientes. Assim, a aplicação de PAMs na alimentação de suínos pode atuar de forma significativa na melhoria do desempenho e na saúde dos leitões, de forma que um intestino saudável é compreendido por altas proporções das vilosidades e profundidade das criptas, e a toxinas expressas por bactérias patogênicas no intestino podem prejudicar o desenvolvimento do intestino provocando inflamações que acometem o desenvolvimento morfológico deste, e assim ocasionar a diarreia em leitões (Zhang et al. 2021).

Para isto, foram feitas análises visuais nas fezes dos leitões (a partir da detecção de diarreia nos mesmos), objetivando, assim, acompanhar a evolução do quadro clínico com a administração do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha. As variáveis avaliadas foram o ganho médio de peso dos leitões (GPD), o escore fecal e o número de dias para cessar a diarreia com a aplicação da formulação.

5.4.2 Experimento Profilático e Terapêutico

O experimento Profilático e Terapêutico contou com um total de 136 leitões (n = 136), no tratamento Profilático, os quais foram divididos em três tratamentos: I) controle (CTRL) com um total de 46 animais, que seguiu o manejo convencional da granja (utilização de antimicrobiano convencional), onde os animais não foram submetidos à administração oral de doses de peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha para a prevenção de diarreia; II) Tratamento 1 (PEP1), contendo 45 animais, onde foram aplicadas três microcápsulas via oral do tipo H2, equivalente a uma massa total de 69,6 µg de peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha e III) Tratamento 2 (PEP2), com um total de 45 animais, onde foi aplicada via oral, uma dose duas vezes acima da dose do PEP1, correspondendo a seis microcápsulas do tipo H2, totalizando uma massa de 139,2 µg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, seguindo as mesmas justificativas do experimento de Remediação. Nos leitões pertencentes aos tratamentos PEP1 e PEP2, foi administrado o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado nas respectivas doses de cada tratamento no 1º, 2º, 5º, 10º e 13º dia após o nascimento. Estes dias foram estabelecidos de acordo com o manejo diário da granja, a fim de provocar o mínimo de estresse nos animais.

Desta forma, neste experimento, os leitões foram avaliados desde o nascimento até os 21 dias de idade, durante a fase de aleitamento. As matrizes e suas respectivas leitegadas estavam alojadas em uma sala de maternidade, com dez gaiolas parideiras equipadas com escamoteadores. Foram selecionadas aleatoriamente dez porcas, alojadas na mesma sala, com ordem de parto variando de 1 a 10 e genética semelhante. Para cada porca selecionada, foi atribuído para sua leitegada, aleatoriamente, a alocação dos tratamentos CTRL, PEP1 e PEP2, controlando-se o efeito materno sobre o desenvolvimento dos leitões. Dessa forma, totalizou-se 136 leitões, dos quais 46 pertenceram ao grupo CTRL e outros 90 ao conjunto de tratamentos PEP1 e PEP2.

Todos os animais deste experimento tiveram acesso a ração fornecida no *creep feeding* e foram submetidos aos manejos diários da granja, descritos a seguir: desgaste de dentes, que tem por objetivo a redução de lesões nos tetos das matrizes e nas leitegadas e corte da cauda, que é uma ação preventiva contra o canibalismo, comum entre os suínos. Ambos os manejos foram realizados logo nas 12 primeiras horas de vida (1º dia de vida). Foi realizada também uma suplementação com ferro, que é um elemento necessário para a constituição da hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio presente nas hemácias e aplicação de Isocox® (troltrazoril) no 2º dia após o nascimento, que é um agente anticoccidiano usado na profilaxia e tratamento da coccidiose (isosporeose suína). Por fim, foi realizada a vacinação usual de *Mycoplasma hyopneumae*, Circovirose e Glaser. A pesagem dos animais foi realizada no início do experimento, nos dias de administração dos tratamentos e ao desmame (21 dias).

Após ministrados todos os tratamentos com o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado, os leitões ficaram em observação diária até o desmame para verificação de ocorrência ou não de diarreia, que foram classificadas visualmente. Caso houvesse a ocorrência de diarreia, foi realizado um experimento “Terapêutico” dentro do experimento Profilático. O tratamento Terapêutico teve um total de 35 animais (n = 35), sendo 11 animais pertencentes ao tratamento CTRL, 13 animais do tratamento PEP1 e 11 animais pertencentes ao tratamento PEP2. Assim, os animais dos tratamentos PEP1 e PEP2 que apresentaram diarreia após a última aplicação dos do peptídeo (13º dia) foram pesados a cada três dias e submetidos a uma dose diária do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha

microencapsulado duas vezes maior, de acordo com o tratamento pertencente (massas médias de 139,2 µg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para o PEP1 e 278,4 µg para o PEP2). Já os animais do tratamento CTRL que apresentaram diarreia foram submetidos a uma dose injetável com antibiótico comercial frequentemente usado na granja (*Microflud F*, tendo como princípio ativo o florfenicol), o qual é indicado para infecções respiratórias e complicações generalizadas dos suínos, causadas por bactérias sensíveis a este antibiótico, como as bactérias Gram negativas. As variáveis analisadas foram aparecimento ou não de diarreia, ganho médio de peso diário (GPD), peso a desmama, escore fecal e o número de dias para aparecimento e cessão da diarreia.

5.5 Análise estatística

Os dados relativos aos escores fecais, para o experimento Profilático/Terapêutico, foram submetidos a análise de correspondência utilizando as funções `CrossTable`, pacote `gmodels` (Warnes et al., 2018), e função `CA` do pacote `FactoMineR` (Le et al., 2008) do software R (R Core Team, 2020). Ainda com os escores fecais, foram calculados para cada animal do experimento Terapêutico 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), tendo no modelo a dose do peptídeo como efeito fixo, para a variável número de dias para cessar a diarreia, e a interação dose do peptídeo e escore fecal, para a variável número de dias em cada classe de escore fecal, e a dose do peptídeo aninhado a mãe como efeito aleatório para ambas as variáveis.

Ainda por meio de análise de variância, foram analisados para ambos os experimentos, o ganho médio diário e o peso a desama, tendo como efeito fixo o tipo ou dose do peptídeo, e como efeito aleatório a mãe. O peso ao nascimento foi utilizado como covariável no modelo para análise do peso a desmana. Para a ANOVA foram utilizadas as funções `lme` do pacote `nlme` (Pinheiro et al., 2020) e `anova` do pacote `stats R` (Fox and Weisberg, 2010) e as médias comparadas por meio de comparações múltiplas utilizando ajuste de multiplicidade de Tukey disponível na função `emmeans` do pacote `emmeans` (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). Independente da análise, P-valor ≤ 0.05 foi considerado como significativo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

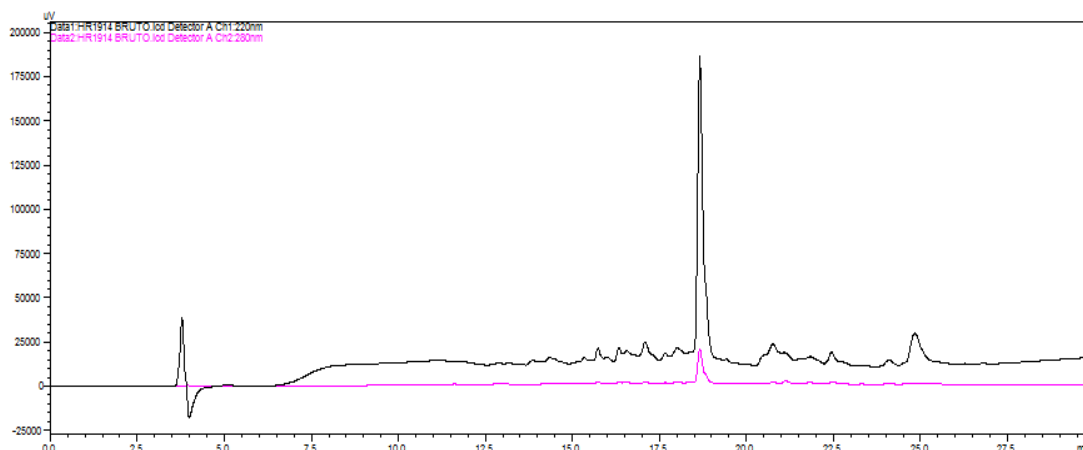
6.1 Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)

A síntese do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha ocorreu com sucesso, obtendo-se bom rendimento nas reações de acoplamentos dos aminoácidos, evidenciados pelos testes de ninidrina negativos. A grande dificuldade encontrada estava relacionada com o reacoplamento de alguns aminoácidos, devido a prováveis agregações das cadeias peptídicas ligadas à resina, o que acarreta na dificuldade da ligação do próximo aminoácido na resina.

Ao final do processo de síntese peptídica em fase sólida, obteve-se uma massa inicial de peptidilresina de 1.735 g, havendo um ganho de massa de 1.133 g. Do total da massa inicial obtida, apenas 0,852 g foram clivados, obtendo uma massa de peptídeo bruto de 0,308 g, porém com um alto teor de pureza. Devido a este elevado teor de pureza, não foi necessário a realização da etapa de purificação do peptídeo. Na Figura 6, é possível observar o perfil cromatográfico de HPLC do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha bruto. Observa-se que o teor de pureza do peptídeo é de 94%, o que, para os estudos deste trabalho, é suficiente para garantir a sua utilização. Desta forma, a etapa de purificação em coluna semipreparativa não foi realizada, passando-se para a próxima etapa, que é a de caracterização via Espectroscopia de Massas.

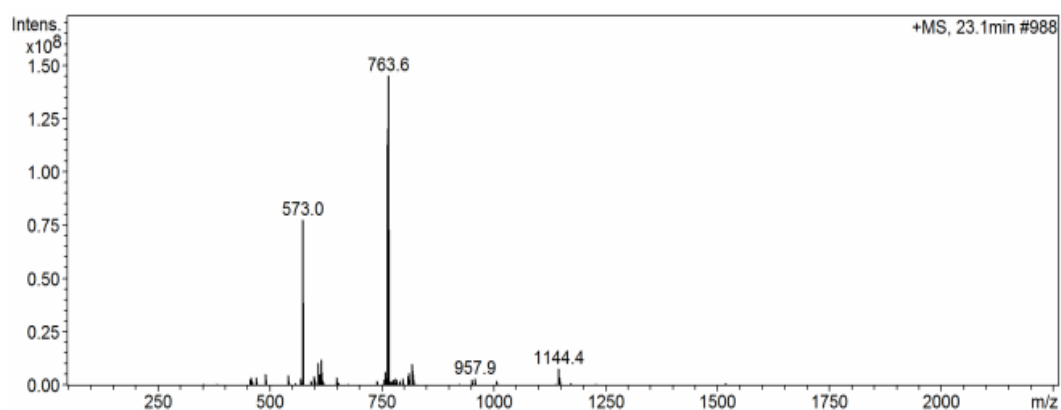
A Figura 7 mostra o espectro de massas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, o qual tem peso molecular teórico de 2.289,72 g/mol, onde é possível confirmar a sua identificação e caracterização. Por meio do espectro de massas, que evidencia a relação dos picos por meio da razão massa/carga (m/Z), é possível observar os picos de m/Z de 1.144,4 ($Z = +2$), 763,6 ($Z = +3$) e 573,0 ($Z = +4$). Com estes resultados, pode-se afirmar que a síntese peptídica em fase sólida foi eficiente para a obtenção do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha bruto, com um alto teor de pureza.

Figura 6. Perfil cromatográfico do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha bruto, com 94% de pureza.



Desta forma, as técnicas cromatográficas utilizadas (HPLC em modo analítico e espectrometria de massas) foram adequadas para a identificação e caracterização correta do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, permitindo uma aquisição com alto rendimento em pureza e massa e, portanto, o avanço para as próximas etapas do trabalho.

Figura 7. Espectro de massas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha bruto, evidenciado a adequada obtenção do peptídeo.

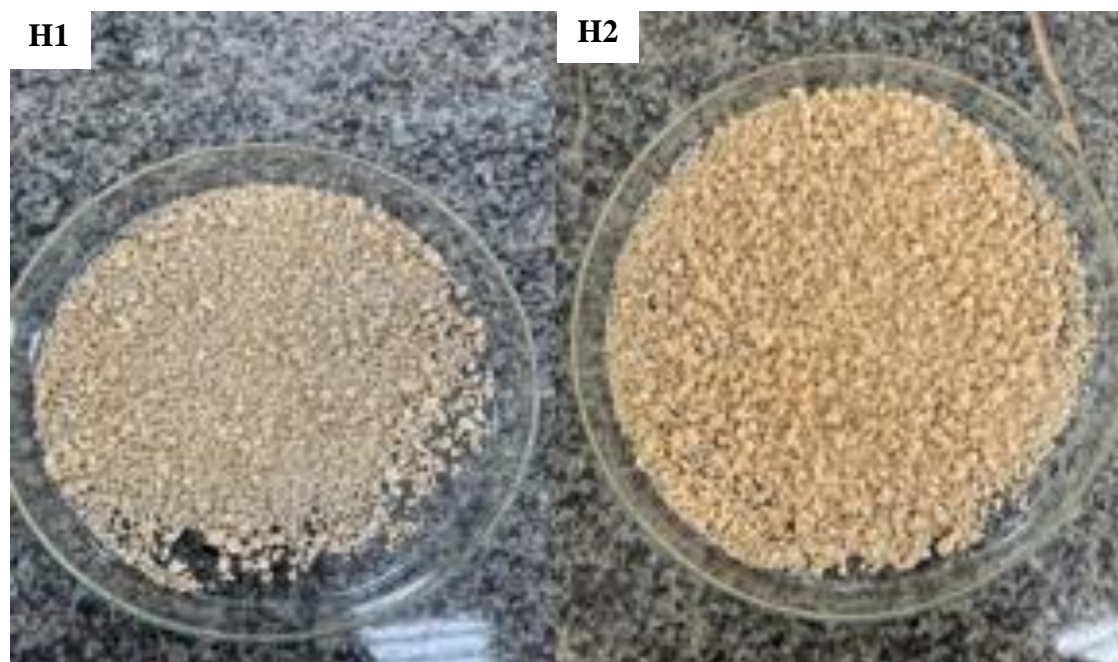


6.2 Microencapsulação

Através do processo de microencapsulação, por meio da gelificação iônica (Figura 8), obtivemos uma massa de 19,1972 g de micropartículas contendo inicialmente 100 mg de massa para o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, aqui denominadas de H1, e 18,5008 g para as microencapsulações contendo inicialmente 200 mg de massa o peptídeo de Ctx(Ile²¹)-Ha, aqui denominadas de H2. Após o revestimento com ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) a 10%, obteve-

se um aumento de 2 e 4% na massa final das partículas, sendo 21,7799 g e 21,4079g de massa final de micropartículas H1 e H2, respectivamente (Figura 8).

Figura 8. Micropartículas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha após o processo de revestimento, apresentando as duas formulações obtidas para aplicação em suínos, as micropartículas H1 e H2.



Fonte: Arquivo próprio.

Para esta quantificação da dosagem incorporada de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, utilizou-se uma alíquota da solução de cloreto de alumínio usada na microencapsulação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha H1 e H2, respectivamente. A dosagem incorporada de peptídeo nas micropartículas foi realizada por meio de um espectrofotômetro UV, ajustado no comprimento de onda em 280 nm, comprimento no qual o aminoácido triptofano, que está presente naturalmente na sequência primária do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, possui absorvância (Apêndice 1).

Segundo os cálculos, pode-se evidenciar que, nas micropartículas revestidas com HPMCP utilizando inicialmente 100 mg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, obteve-se um total de incorporação nas micropartículas de 84,7 mg desta molécula, resultando num rendimento de 84,7% de encapsulamento do peptídeo pelo método de gelificação ionotrópica. Da mesma maneira, para as

micropartículas revestidas com HPMCP utilizando inicialmente 200 mg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, obteve-se um total de incorporação de 175 mg desta molécula, resultando num rendimento de encapsulação de 87,5%. Além disso, é necessário a realização do cálculo de quanto de massa do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi incorporado por microcápsula, utilizando-se da massa média de dez microcápsulas após o processo finalizado de gelificação ionotrópica (Apêndice 2). Estes dados demonstram que a técnica de gelificação ionotrópica foi eficiente para revestir e formular o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para a sua utilização na nutrição de suínos.

6.3 Caracterização das micropartículas com peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha

6.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

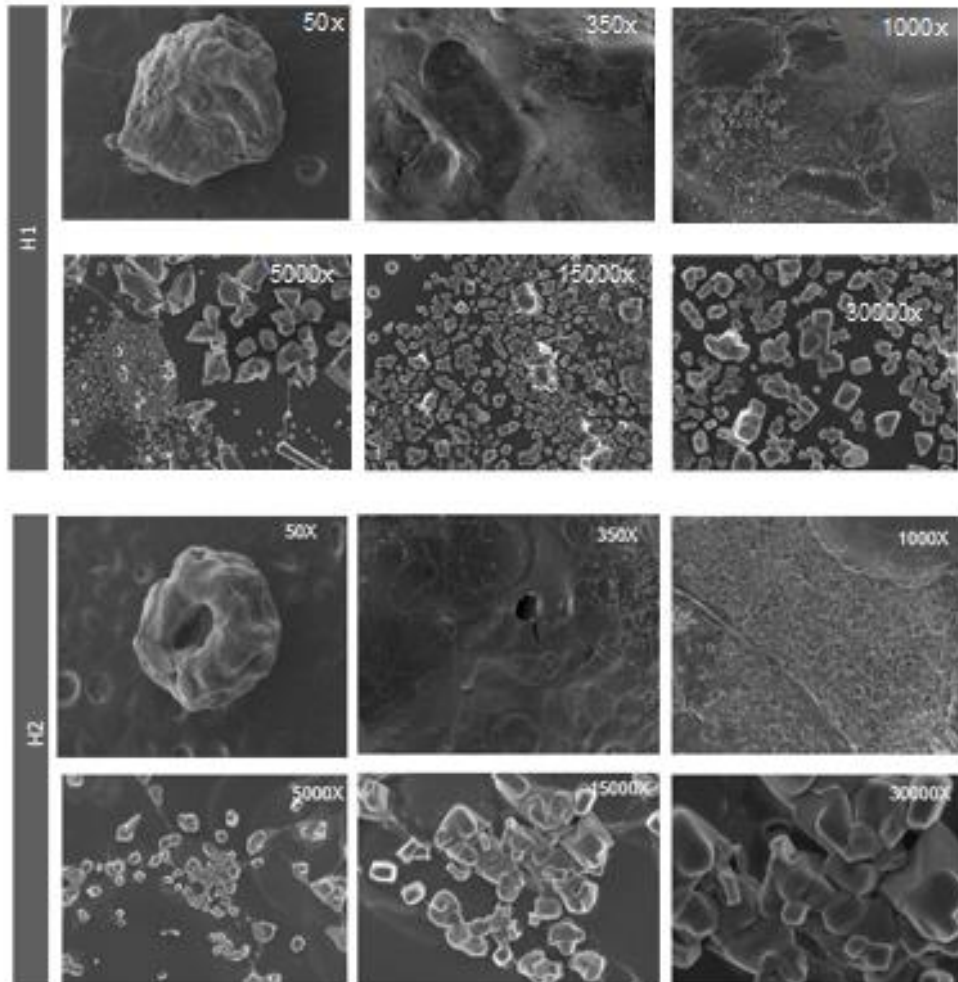
A caracterização das micropartículas é necessária para se evidenciar a homogeneidade da incorporação e seus aspectos físico-químicos, como estabilidade e proteção do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, buscando um melhor entendimento e conhecimento do composto formulado. Por meio do MEV é possível obter uma escala de ampliação de até 300.000X, com grande profundidade de foco. O MEV é muito utilizado para avaliar a topografia de superfície de objetos sólidos, fornecendo informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos da amostra, porém não é possível obter informações sobre a estrutura interna desses objetos (Galleti, 2003).

Com esta finalidade, foi realizado a caracterização das partículas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A Figura 9 apresenta as micropartículas H1 e H2 formuladas com o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha. As micrografias demonstraram que as amostras apresentam morfologia quase esféricas, com superfícies porosas e presença de cristais, que representam o peptídeo cristalizado.

Diversos sistemas encapsulados com alginato, apresentam estruturas deformes após da secagem devido à perda de água interna. Este evento não interfere na liberação dos compostos bioativos oferecido pelo alginato, o que é benéfico para nosso sistema (Deladino et al., 2008). A presença de cristais na es-

trutura interna, estariam relacionados aos resíduos de cloreto de alumínio na superfície, pelo que se recomenda utilizar soluções de lavado após o encapsulamento (Anbinder et al., 2011).

Figura 9. Micrografias do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha encapsulado.



Fonte: Arquivo próprio.

6.3.2. Difração de Raios X (DRX)

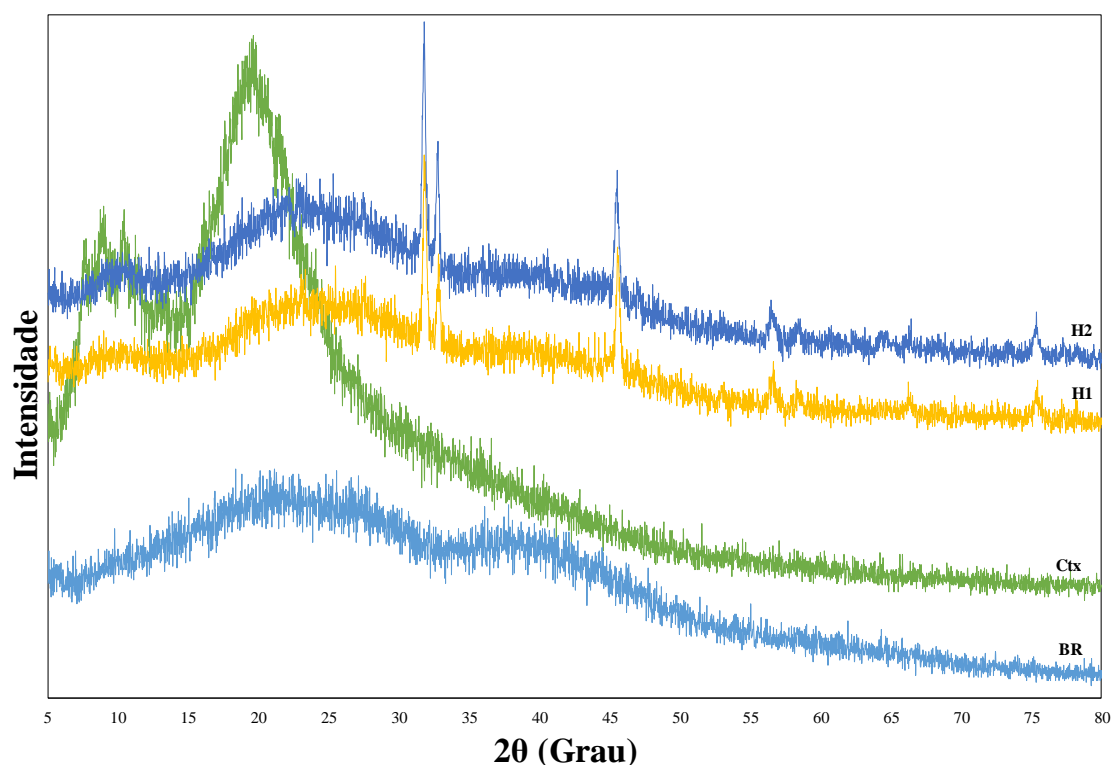
Através da Difração de raios X (DRX) dos cristais é possível estudar pequenas estrutura da matéria. Por meio da natureza e da difração dos raios x é possível o estudo de substâncias cristalinas, isso se dá ao fato dos cristais atuarem como redes de difração para os raios x, possibilitando assim a identificação de estruturas cristalizadas (DA Silva, 2013).

O uso de polímeros como protetores bioativos é comumente empregado na indústria farmacêutica, pois auxilia na redução da cristalinidade dos medicamentos e, por sua vez, permite aumentar sua estabilidade (Al-obaidi e Buckton,

2009), que também pode ser observada nas micrografias de MEV e confirmada pelos dados do FTIR e FTRaman. Após o método combinado de microencapsulação, os picos característicos de alginato e celulose (conformação de HPMCP puderam ser visualizados por meio das análises de DRX (Figura 10). Além disso, a diminuição da intensidade da região cristalina do peptídeo, que se confirma como um material semicristalino e, portanto, com alta estabilidade.

As intensidades evidenciadas a 10° evidenciam a presença da alfa-hélice dos peptídeos e proteínas, assim como a 20° , a qual identifica a folha- β da estrutura interna dos peptídeos. As mudanças destas intensidades indicariam a perda da cristalinidade ou voltando-se uma molécula semicristalina. Isto, em consequência, favorece a estabilidade para serem aplicados como sistemas de liberação de aditivos encapsulados *in vitro* ou *in vivo* (Desai et al., 2005).

Figura 10. Perfis de DRX do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado.



6.3.3 Análises térmicas

Análises térmicas podem ser definidas como um conjunto de técnicas que são utilizadas para avaliarem as variações das propriedades físicas que uma determinada amostra sofre em função da temperatura. A análise termogravimétrica (TGA) é uma análise termo analítica que entende a variação da massa da

amostra em função da temperatura, ou seja, por meio desta técnica é possível acompanhar a perda e/ou ganho de massa de uma amostra em função do tempo ou da temperatura. Enquanto a termogravimétrica derivada (DTG), é um arranjo matemático, no qual a DTG é a derivada da primeira TGA, ou seja, a derivada da massa em relação ao tempo (dm/dt) é capturada em função do tempo ou da temperatura (Denari e Cavalheiro 2012).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) pode ser caracterizada como uma técnica termo analítica em que as variações de entalpia da amostra são verificadas em relação a um material de inércia termicamente enquanto ambas são submetidas a uma temperatura controlada (Denari e Cavalheiro 2012).

Particularmente, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha puro mostrou uma alta estabilidade térmica até os primeiros 100°C, observando-se, após isso, uma perda de massa muito lenta. O branco (BR), sendo o padrão sem peptídeo, tem uma perda de massa que se inicia com o aquecimento, algo que indicaria não ser muito estável frente à temperatura. As micropartículas H1 e H2 apresentaram uma estabilidade alta similar comparada ao peptídeo inicial, fato que se pode deduzir que os polímeros da microencapsulação aumentaram o nível de resistência frente à temperatura outorgada do peptídeo antimicrobiano por efeito da mistura, observando uma perda menor de massa. Este efeito ajudaria a obter produtos muito estáveis e com diferentes aplicações. As análises foram expressas em porcentagem em relação a temperatura (Figura 11).

Para as análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC - Figura 12), foi utilizada como referência uma microcápsula sem peptídeo (branco). Assim, é possível verificar que os picos presentes apareceram também nas microencapsulações H1 e H2 do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, os quais se encontram alguns graus fora do padrão. Isto é devido a presença do peptídeo puro, o qual poderia ter influenciado a estrutura (Zhang & Kosaraju, 2007).

Figura 11. Análise termogravimétrica por TGA (azul)/dTGA (marrom)/DSC (rosa) das micropartículas contendo o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha.

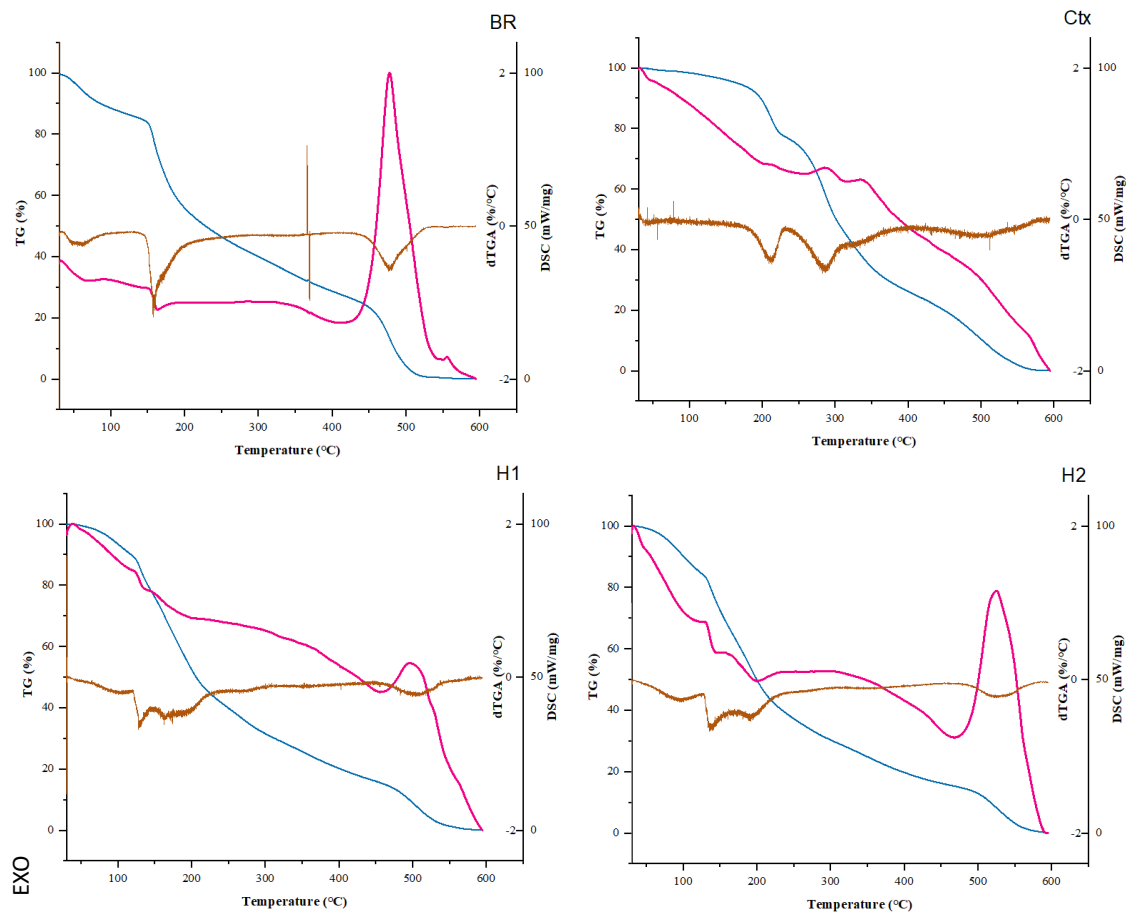
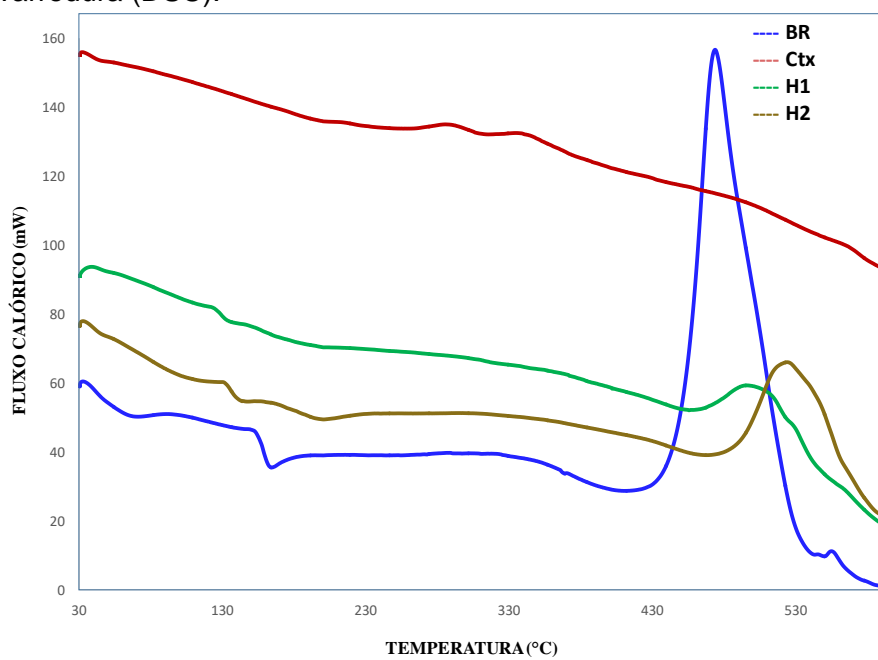


Figura 12. Caracterização das micropartículas por calorimetria diferencial de varredura (DSC).



Nas análises de DSC, foi utilizada como base também um microcápsula sem peptídeo (branco) e, com isso, foi possível observar que os picos por ela emitidos são das microcápsulas que continha o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, indicadas pelas curvas H1 (verde) e H2 (marrom), como se pode evidenciar na Figura 13.

Os picos da primeira derivada do TGA (dTGA) ajudam a determinar os diferentes eventos relevantes de termo-oxidação dos produtos. Isto significa que estes picos poderiam determinar um câmbio drástico da conformação estrutural e é proporcional a velocidade de decomposição de massa (Woranuch e Yoksan 2013). Na Figura 12, este evento está quase imperceptível para o peptídeo Ctx puro, o que significa que este peptídeo é termoestável em temperaturas de produtos alimentícios ou aditivos antimicrobianos. No entanto, o empacotamento com os biopolímeros acelerariam o processo de perda de massa após os 100°C, pois eles possuem energia interna que poderia desestabilizar o peptídeo pelas colisões de partículas a altas temperaturas (Lim e Ahmaad., 2017)

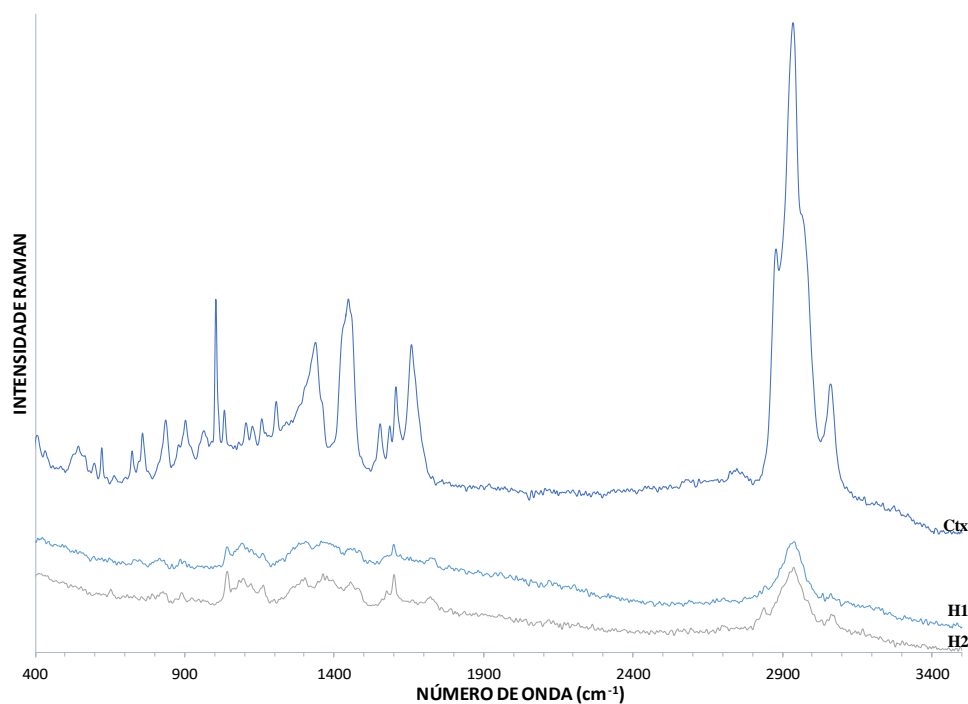
6.3.4. Análises do FTIR/FT-Raman

FT-Raman é uma técnica que utiliza um feixe de luz monocromática que em contato com a amostra é espalhada por ela, produzindo assim uma luz com a mesma energia, ou com energia diferente da luz incidente. Por meio desta técnica é possível identificar as ligações existentes nas moléculas que constituem a amostra. Além disso a partir de vibrações é possível também identificar o tipo e a quantidade de ligações que constituem a amostra (Rodrigues e Galzerani 2012).

FT-Raman evidenciou as bandas características dos peptídeos e proteínas, como a estrutura secundária: Amida I: alongamento C=O, C=C e a α -hélice detectada em 1.661,5 cm⁻¹ (muito forte); Amida III: deformação (CH₂) em 1.299,5 cm⁻¹ (ombro); folha β em 1.232 cm⁻¹ (fraca) (Balgoon, Ahmed & Qusti, 2018). Além disso, os aminoácidos aromáticos apresentam um anel benzeno, que se destaca na região um estiramento de CH em 2.979, 3.030 y 3.057 cm⁻¹, balançando-se a ~1260 cm⁻¹; com uma deformação na região próxima a 704 cm⁻¹ (Aliaga et al., 2009). Desta maneira, a técnica de FT-Raman complementou os

resultados do FTIR, além de auxiliar alguma interferência com a água nas análises do FTIR, pois a água não interfere no espalhamento do FT-Raman (Figura 13).

Figura 13. Espectro Raman das amostras microencapsuladas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, H1 e H2.

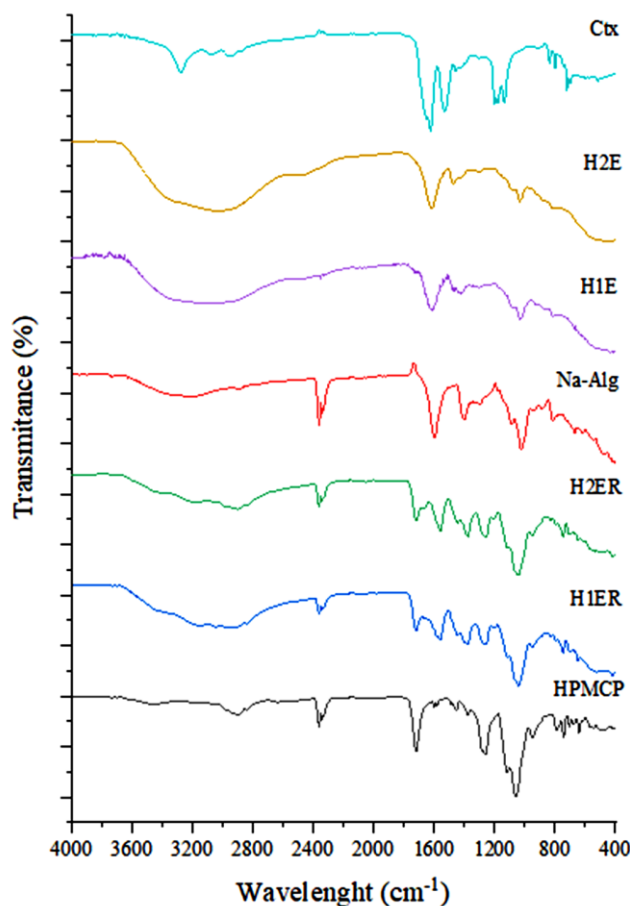


A FTIR também foi utilizada para acompanhar a conformação dos grupos funcionais dentro da estrutura química do processo de encapsulação e evidenciar uma estabilidade físico-química estrutural. Os peptídeos e proteínas possuem bandas de reconhecimento baseados na formação das ligações peptídicas (amida). Os picos de $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (alongamento C=O) e $\sim 1.540\text{ cm}^{-1}$ (vibrações por flexão N–H e alongamento C–N do eixo principal do peptídeo) indicam a presença das bandas de amida I e amida II, respectivamente (Andrushchenko et al., 2006), as quais são características das ligações peptídicas presentes no peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha como mostrou-se na Figura 14.

Os picos do FTIR característicos dos aminoácidos aromáticos como o triptofano e da fenilalanina da sequência são observados em 1.136, 1.180, 1.202

cm^{-1} (Ciobanu et al., 2016) A avaliação da presença destes aminoácidos é essencial para realizar uma correta quantificação durante os diversos processos analíticos.

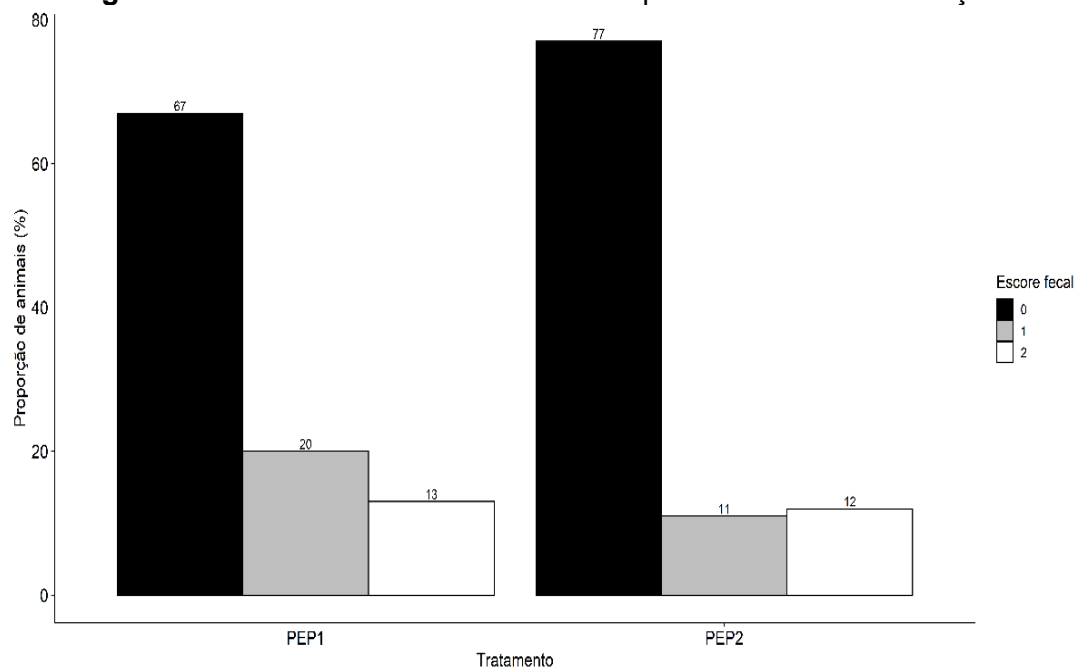
Figura 14. Resultados de FTIR nas amostras microencapsuladas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, H1 e H2, no material de revestimento HPMCP, no peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha.



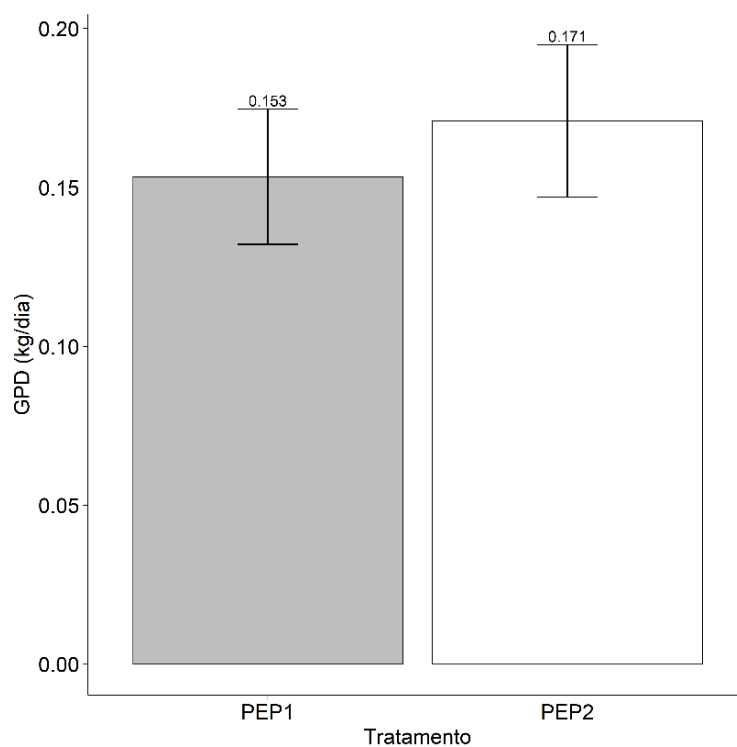
6.4 Experimentos *in vivo* de aplicação das microcápsulas em leitões

6.4.1 Remediação: avaliação preliminar

Quanto à análise de escore fecal, não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, o tratamento PEP2, que recebeu uma dose maior do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado, apresentou 77% dos animais que se recuperaram mais rápido em relação ao tratamento PEP1 (67%) (Figura 15). A rápida recuperação dos animais é de extrema relevância para a produção de suínos, visto que o fato de estarem com diarreia prejudica diretamente o seu desempenho zootécnico.

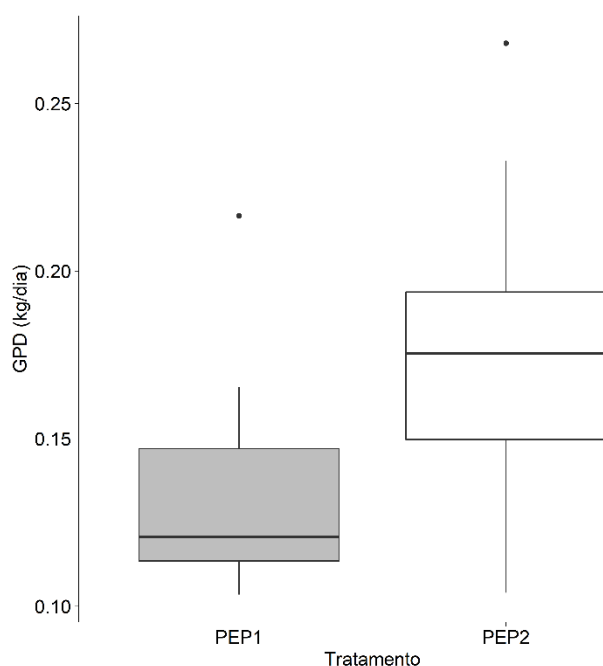
Figura 15. Escore fecal dos animais dos experimentos de Remediação

As duas etapas que foram realizadas no experimento de Remediação entre os tratamentos PEP1 e PEP2 também não influenciaram no ganho de peso dos animais ($P > 0,05$) e pode ser observado na Figura 16.

Figura 16. Ganho de peso médio diário dos leitões dos experimentos de Remediação: avaliação preliminar da etapa 1 (PEP1) e da etapa 2 (PEP2).

Entretanto, os animais que receberam o PEP2 apresentam uma variação maior no ganho de peso ao contrário dos animais que receberam o PEP1 apresentam um ganho de peso mais homogêneo (Figura 17).

Figura 17. Variação de ganho de peso médio diário dos leitões dos experimentos de Remediação: avaliação preliminar da etapa 1 (PEP1) e da etapa 2 (PEP2).



Este fato é corroborado pelo estudo realizado por Dutra et al. (2011), os quais relataram que o *Bacillus subtilis* foi capaz de manter o controle intestinal, porém não exerceu efeito significativo sobre o desempenho de leitões desafiados com bactérias Gram-Negativas, como a *E. coli*. Segundo Johansen et al. (2004), um leitão acometido com diarreia pode ter redução de peso significativo em relação a um animal saudável. Portanto, pode representar um problema desafiador na cadeia produtiva de suínos. Em contrapartida, Yoon et al. (2014) relataram que a suplementação dietética com peptídeo antimicrobiano sintético A-3 e P-5 atuou de forma positiva no desempenho de crescimento de leitões desmamados, com idade de 28 dias de idade.

Mesmo que os animais do tratamento PEP1 tenham permanecido mais dias no escore fecal 1 (fezes muito pastosas) e o tratamento do PEP2 conseguiu cessar a diarreia dos animais em menos dias, verificou-se que não houve efeito

significativo dos tratamentos sobre o número de dias em cada escore fecal e o número de dias que cada tratamento levou para cessar a diarreia, o que pode ser observado abaixo nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Figura 18. Número de dias em cada escore fecal dos leitões dos experimento de remediação.

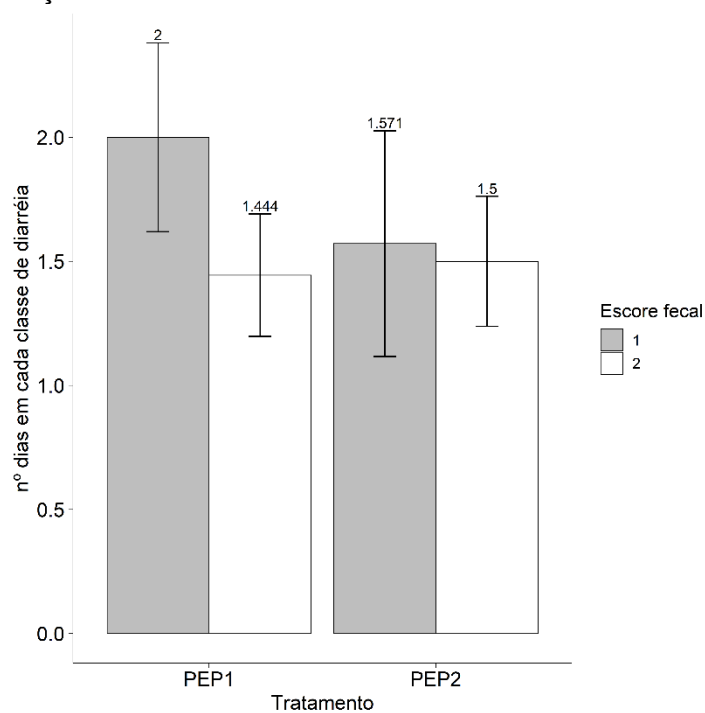
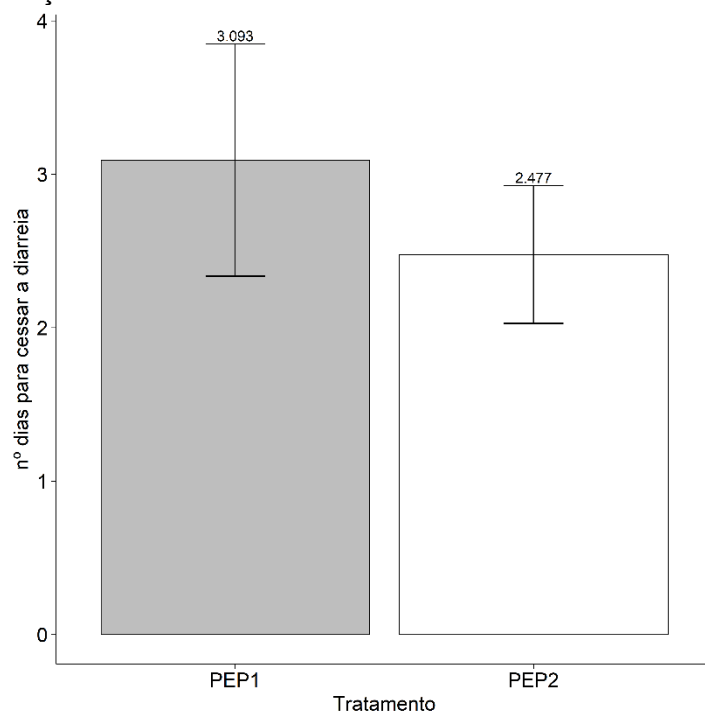


Figura 19. Número de dias para cessar a diarreia dos leitões nos experimentos de remediação.



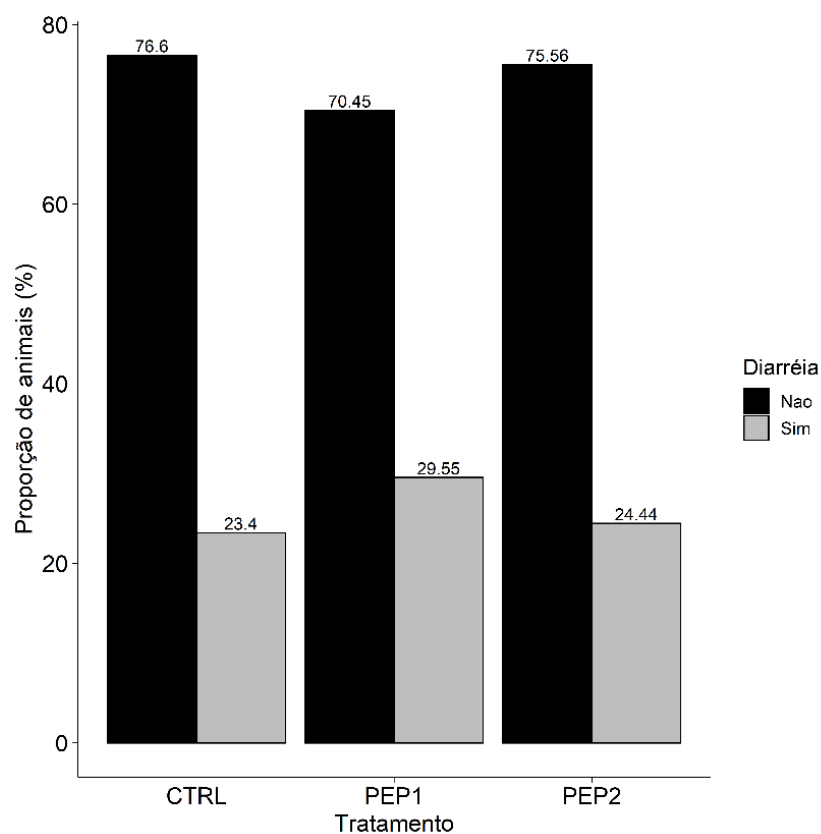
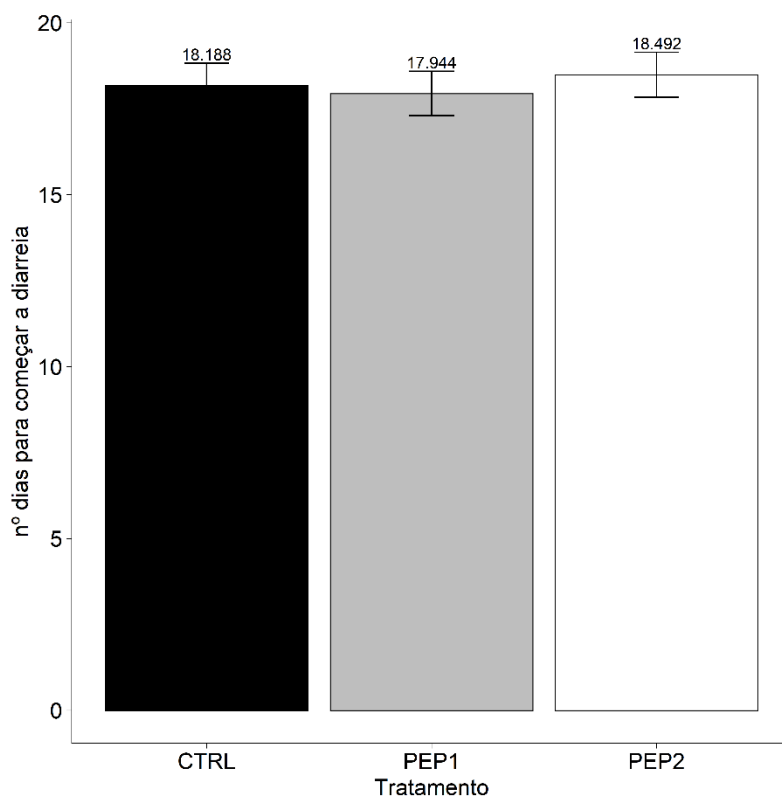
Em estudos realizados por Utiyama et al. (2006), avaliando o efeito de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais em leitões desmamados, concluíram que estes aditivos não influenciaram a microbiota dos animais e a incidência de diarreia em leitões desmamados. Porém, os agentes antimicrobianos promoveram melhora no desempenho dos animais; o prebiótico teve desempenho equivalente ao obtido com os antimicrobianos nos primeiros 14 dias de experimentação. Em contrapartida, o probiótico e os extratos vegetais, no entanto, não propiciaram nenhuma melhora ou benefício aos animais.

6.4.2 Profilático e Terapêutico

Os leitões dos três tratamentos do experimento Profilático não apresentaram diferenças significativas para o aparecimento ou não de diarreia ($P > 0,05$) (Figura 20), e para o número de dias para início da diarreia ($P > 0,05$) (Figura 21). Uma possível hipótese é de que, devido a uma possível grande carga bacteriana que causou a diarreia, o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha não foi eficaz o suficiente para conter o distúrbio, o que pode ter sido causado por uma liberação incompleta ou ineficiência de ação.

Em contrapartida, vários trabalhos da literatura utilizando os PAMs demonstraram efeitos positivos sobre a incidência de diarreia, como o estudo realizado por Xiong et al. (2014), no qual utilizaram uma mistura de peptídeos antimicrobianos contendo lactoferrina, cecropina, defensina e plectasina para suplementação em dieta de leitões com diferentes concentrações. Os resultados mostraram dados benéficos sobre a incidência de diarreia nos animais que receberam uma dieta contendo a dose maior de concentração de PAMs, os quais tiveram uma ampla atuação e um espectro de ação eficiente para conter a infecção.

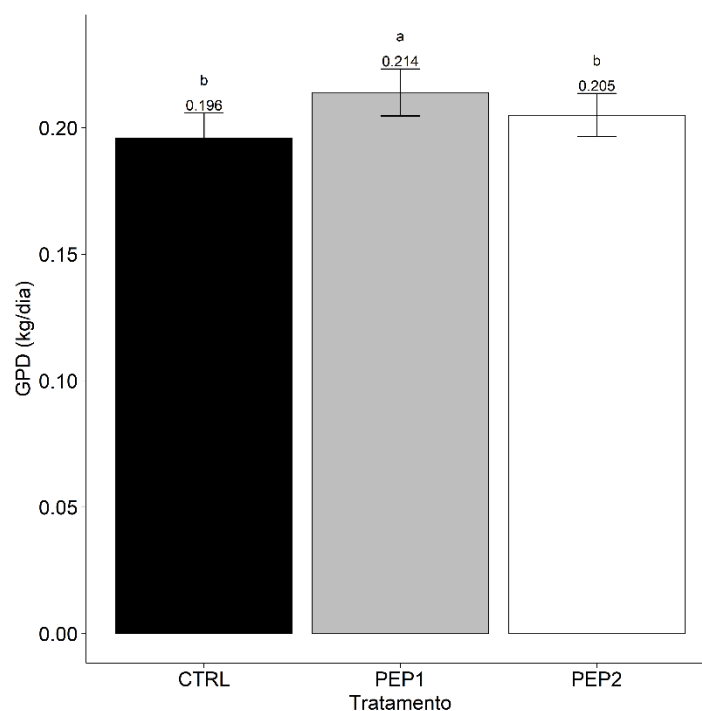
Em um outro estudo realizado por Wu et al. (2012), animais desafiados pós desmame com *E. coli* K88 apresentaram menor índice de diarreia, quando receberam uma dieta contendo o peptídeo antimicrobiano cecropina AD ou uma dieta contendo antibiótico em relação aos animais do grupo controle. Este resultado também corrobora com o estudo de Yi et al. (2016), que relataram que o peptídeo Catelicidina-Wa (CWA) pode ser uma alternativa eficaz contra a diarreia em leitões desmamados, já que o CWA atuou de forma significativa na morfologia intestinal, barreira intestinal, além de revigorar a microbiota dos animais.

Figura 20. Incidência de diarreia nos tratamentos.**Figura 21.** Numero de dias para começar a diarreia.

Neste mesmo contexto de antibióticos naturais alternativos, em estudo realizado por Zhao et al. (2015), avaliando os efeitos de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus plantarum* na suplementação de dieta em diferentes parâmetros de leitões após o desmame, foi relatado que os animais que receberam tratamento que continha *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus plantarum*, tiveram um menor índice de diarreia, em relação aos animais que receberam uma dieta controle.

Em relação ao aparecimento de diarreia, foram observadas diferenças significativas para os resultados de GPD ($P=0,005$), que pode ser observado na Figura 22.

Figura 22. Ganho médio de peso diário (GPD) dos leitões durante a fase de maternidade.

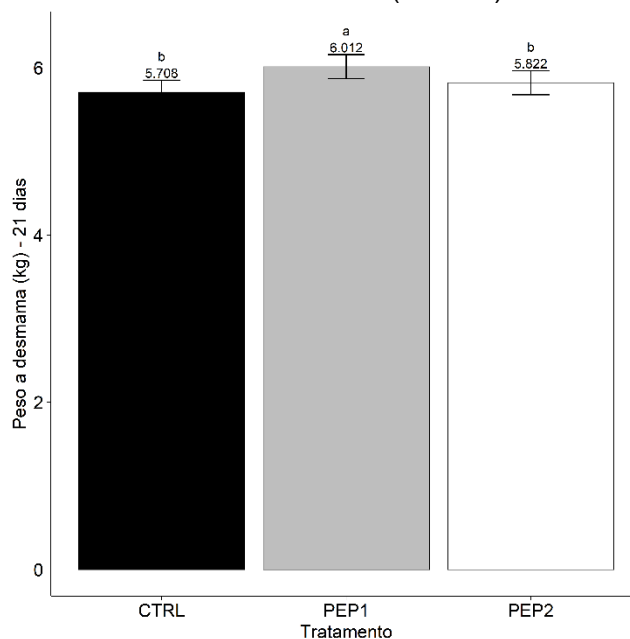


O tratamento PEP1 foi o que apresentou um maior GPD (0,214 kg/dia e 6,01 kg, respectivamente), havendo assim uma diferença de 18 g de ganho de peso a mais por dia e no tratamento PEP2, 9 g a mais de GPD para os animais em comparação aos leitões do tratamento CTRL. Em estudo realizado por Tang et al. (2012), com suplementação dietética com lactoferrampina-lactoferricina para leitões desmamados com 21 dias, também se observou um aumento do ganho de peso diário dos animais. Estes dados corroboram com os encontrados

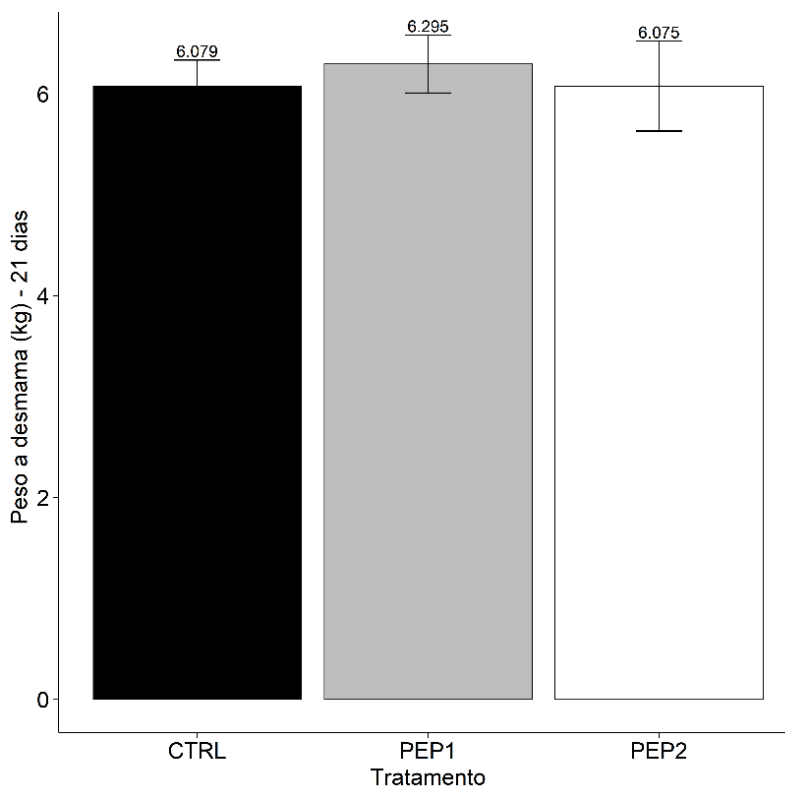
por Xiao et al. (2015), em que descreveram que a ação dos PAMs está ligada à sua ação antibacteriana, obtendo assim efeitos significativos no desempenho de suínos.

Em um estudo realizado por Yu et al. (2017), utilizando o peptídeo antimicrobiano Microcin J25 (MccJ25) produzido por meio de uma cepa de *Escherichia coli* contendo 21 aminoácidos (coincidentemente, o mesmo número de aminoácidos do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha), foi observado que a suplementação alimentar deste peptídeo melhorou de forma significativa o desempenho, atenuou a diarreia e a inflamação sistêmica, aumentou a função da barreira intestinal e melhorou a composição da microbiota fecal de leitões desmamados. Assim, de um modo geral, e considerando o potencial que os PAMs têm mostrado contra bactérias Gram-negativas nos estudos acima, os resultados deste presente estudo com o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado demonstraram ser satisfatórios e estatisticamente significativos.

O peso a desmama também apresentou efeitos significativos ($P \leq 0,05$), os quais podem ser observados na Figura 23. Os animais do tratamento PEP1 tiveram um peso maior ao desmame (6,01 kg), enquanto os pesos dos animais dos tratamentos PEP2 (5,82 kg) e CRTL (5,71 kg), foram estatisticamente iguais. Estes dados são corroborados com o estudo realizado por Yoon et al (2013), onde os autores relataram que animais tratados com uma dieta contendo o peptídeo A5 (AMP-P5) e com uma dieta contendo antibiótico demonstraram melhor desempenho zootécnicos, digestibilidade aparente do trato total de matéria seca, proteína bruta e energia bruta e redução de coliformes fecais e intestinais, em relação aos animais que receberam uma dieta controle. Em adição, também está de acordo com estudo realizado por Zhang et al. (2021), que relataram que leitões desmamados acometidos pela *E. coli*, que receberam o peptídeo antimicrobiano WK3 exerceram efeito significativamente no desempenho dos leitões desmamados, além de atenuar a diarreia.

Figura 23. Peso a desmama dos leitões (21 dias).

O experimento Terapêutico ($n = 35$), o qual foi realizado em paralelo com o experimento Profilático, quando analisado isoladamente, não registrou efeito significativo para as análises de escore fecal ($P > 0,05$) e peso na desmama ($P > 0,05$), como pode ser observado na Figura 24.

Figura 24. Peso a desmama dos animais que receberam tratamento terapêutico.

Entretanto, apesar de não apresentar diferenças significativas na análise estatística realizada, em um ponto de vista econômico para o produtor, pode ser vantajoso o uso do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha como aditivo para a produção de suínos, de modo que todo incremento no peso do animal é um resultado positivo para o produtor.

Em adição, não houve efeito significativo para as análises número de dias em cada escore fecal ($P > 0,005$) (Figura 25), e número de dias para cessar a diarreia ($P > 0,05$), (Figura 26), no experimento Terapêutico. Todos os animais cessaram a diarreia ao mesmo tempo. Desse modo, pelo fato de ter utilizado um medicamento de antibiótico comercial no tratamento CTRL, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha conseguiu alcançar o mesmo efeito que o medicamento usual da granja, garantindo assim o mínimo efeito quando foi necessário. Este resultado é de grande importância e relevância para a consideração do uso de um substituto para os antibióticos convencionais sintéticos, principalmente por não deixar resíduos nos animais. A ação antimicrobiana dos PAMs dificulta a ação das bactérias em adquirirem resistência, o que justifica a aplicação dos PAMs na produção de suínos, e dessa maneira evitar a utilização desenfreada de antibióticos (Wang et al 2019).

Figura 25. Número de dias em cada escore fecal.

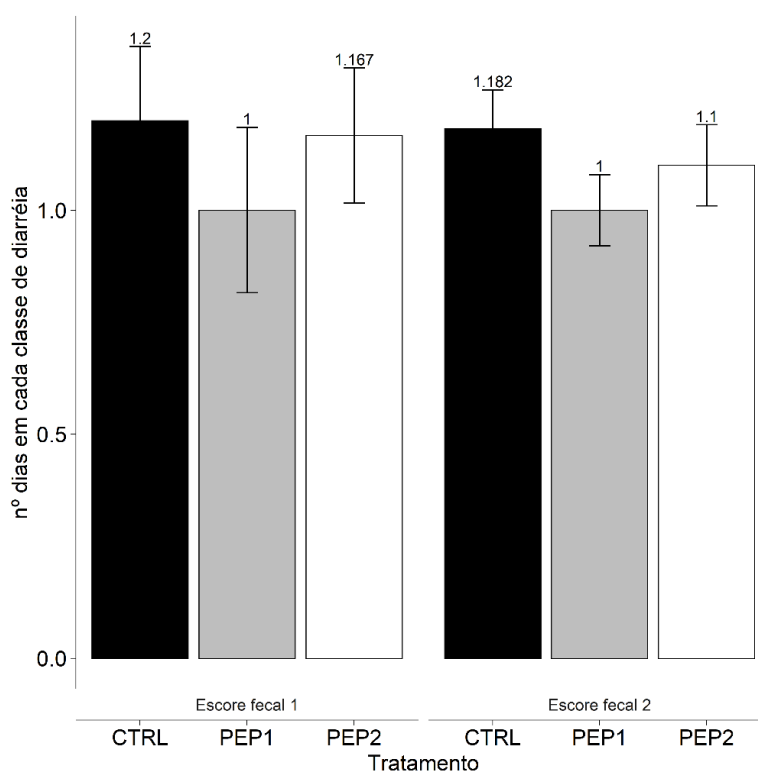
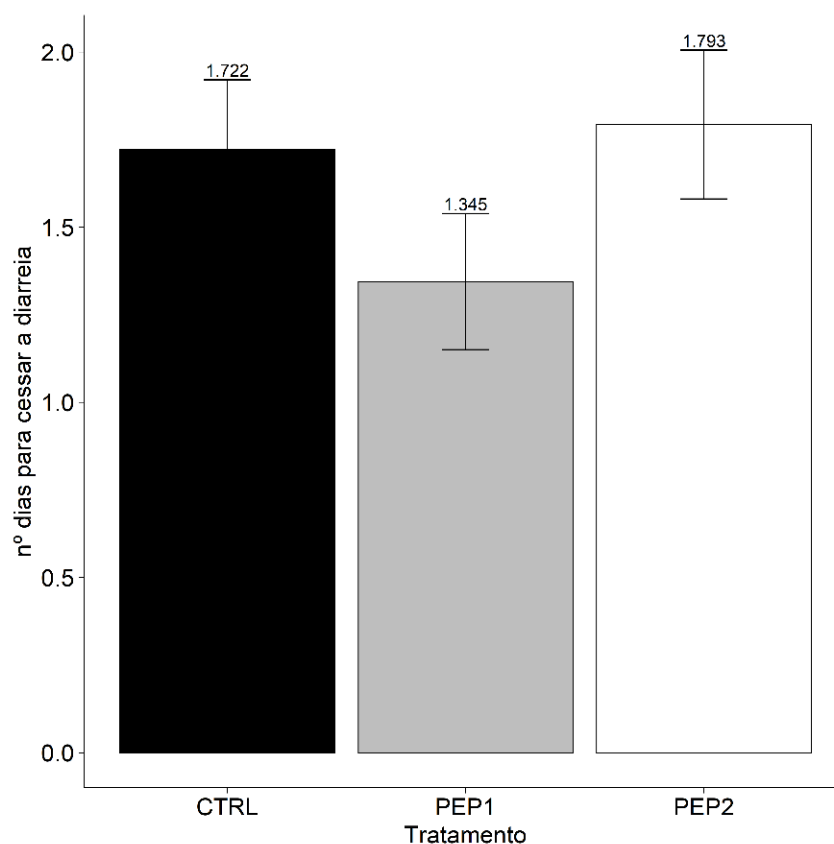


Figura 26. Número de dias para cessar a diarreia.



Estes resultados também foram encontrados por Wang et al. (2007), onde relataram que, ao utilizar lactoferrina na dieta de leitões desmamados, não houve efeito significativo no controle de diarreia entre o tratamento que se empregou o PAM e o tratamento que utilizou antibiótico.

Em um outro trabalho de Cutler et al. (2007), os autores descreveram que a inclusão dietética de Colicina E1 teve eficácia na prevenção de diarreia de leitões pós desmamados que foram inoculados experimentalmente por *E. coli* F18 positiva que é uma bactéria Gram-negativa, além de se observar uma melhora no desempenho zootécnico destes animais. Além disso, os animais que foram tratados com uma dose menor de Colicina E1, ganharam em média 540 g e os animais tratados com uma dose maior ganharam 940 g, enquanto os animais do grupo controle ganharam em média 340 g, quatro dias após a inoculação.

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 Farmacotecnia 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](https://doi.org/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, Chicovski 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, Tarhiz 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

APÊNDICE I

Cálculo do doseamento da micropartícula H1

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

$$0,0761 = 5690 \cdot c \cdot 1$$

$$A = 13.374 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$$

$$2.289,7 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$X \text{ ----- } 13.374 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0306 \text{ g L}^{-1}$$

$$1 \text{ L} \text{ ----- } 0,0306 \text{ g}$$

$$0,5 \text{ L} \text{ ----- } y$$

$$y = 0,0153 \text{ g} = \mathbf{15,3 \text{ mg}}$$

$$CT = CR + CM$$

$$100 \text{ mg} = 15,3 \text{ mg} + CM$$

$$CM = \mathbf{84,7 \text{ mg}}$$

onde **CT** corresponde a massa total teórica de peptídeo adicionada na reação, **CR** é a massa de peptídeo que ficou retida na solução reticulante e **CM** é a massa de peptídeo total incorporada no processo de microencapsulação final.

Cálculo do doseamento da micropartícula H2

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

$$0,1243 = 5690 \cdot c \cdot 1$$

$$A = 21.848 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$$

$$2.289,7 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$x \text{ ----- } 21.848 \times 10^{-6}$$

$$x = 0,0500 \text{ g L}^{-1}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ L} \quad \text{-----} \quad 0,0500 \text{ g} \\ 0,5 \text{ L} \quad \text{-----} \quad y \\ y = 0,0250 \text{ g} = \mathbf{25 \text{ mg}} \end{array}$$

$$CT = CR + CM$$

$$200 \text{ mg} = 25 \text{ mg} + CM$$

$$\mathbf{CM = 175 \text{ mg}}$$

APÊNDICE II

Cálculo da quantidade de peptídeo por micropartícula H1

$$CM_{H1} = 84,7 \text{ mg} = 0,0847 \text{ g}$$

$$\text{Massa total de micropartículas obtidas} = 21,779 \text{ g}$$

$$\text{Massa média de uma microcápsula} = 2,84 \text{ mg} = 0,00284 \text{ g}$$

$$21,779 \text{ g} \text{ ----- } 0,0847 \text{ g}$$

$$0,00284 \text{ g} \text{ ----- } x$$

$$x = 11 \text{ } \mu\text{g de peptídeo Ctx(Ile}^{21}\text{)-Ha/microcápsula H1}$$

Cálculo da quantidade de peptídeo por micropartícula H2

$$CM_{H2} = 175 \text{ mg} = 0,175 \text{ g}$$

$$\text{Massa total} = 21,4079 \text{ g}$$

$$\text{Massa média de uma microcápsula} = 2,84 \text{ mg} = 0,00284 \text{ g}$$

$$21,4079 \text{ g} \text{ ----- } 0,175 \text{ mg}$$

$$0,00284 \text{ g} \text{ ----- } y$$

$$y = 23,2 \text{ } \mu\text{g de peptídeo Ctx(Ile}^{21}\text{)-Ha/microcápsula H2}$$