**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Utilização de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) em dietas de leitões recém-desmamados

Maicon Sbardella

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

Maicon Sbardella
Zootecnista

Utilização de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) em dietas de leitões recém-desmamados

Orientador:
Prof. Dr. **VALDOMIRO SHIGUERU MIYADA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Sbardella, Maicon

Utilização de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) em dietas de leitões recém-desmamados / Maicon Sbardella. - - Piracicaba, 2014.
103 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Aditivo 2. Microbiota 3. Deposição de Gordura 4. Desempenho 5. Suíno I. Título

CDD 636.4085
S276u

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

*A Deus,
por todos os momentos que caminhamos juntos...*

DEDICO

*Aos meus pais,
Vilmar Antônio Sbardella e Elisete Maria Dal Pizzol Sbardella,*

que são o alicerce da nossa família, sendo compreensivos até nos momentos da nossa ausência, e que sempre possuem serenidade e sabedoria para nos ajudar a enfrentar todas as situações surpreendentes da vida... E que foram incansáveis durante esta longa jornada, renunciando de seus próprios sonhos e por muitas vezes até da sua saúde, apenas pela recompensa de ver seus filhos formados... Se isso tudo não é amor, então o que mais pode ser?

*À minha irmã,
Ana Paula Sbardella,*

a quem devo grande parte desta conquista... Apenas digo que tenho o maior orgulho do mundo por ter você na minha vida. P.S. Eu também te amo!

*Com todo o amor e gratidão,
OFEREÇO*

*Ao meu orientador e amigo,
Prof. Dr. Valdomiro Shigueru Miyada,*

por todo o conhecimento compartilhado, pelo exemplo de comprometimento e dedicação de uma vida toda em prol da educação e pela sua contribuição para o progresso da ciência.

*Com carinho,
HOMENAGEIO*

“O trabalho enobrece o homem”
Max Weber

“Um país é feito de homens e de livros”
Monteiro Lobato

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realização do programa de doutoramento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2012/01005-3) e auxílio pesquisa (Processo 2012/00949-8).

Ao Prof. Dr. Valdomiro Shigueru Miyada (ESALQ), pela orientação, atenção, confiança, paciência e ensinamentos que muito contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten (ESALQ), pelas discussões e ensinamentos.

Aos funcionários do Setor de Suinocultura (ESALQ), José Pires Alves Sobrinho, Leonilço Ramos e Gilberto Antonio Aliberti Júnior, pela imensurável colaboração na rotina diária do experimento e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia (ESALQ), especialmente Antônio Carlos Oliva, pelo auxílio na confecção das dietas, José Henrique Rocha, pela prontidão, e José Kossut Knapik e Paulo Marcos de Oliveira, pelo auxílio durante os abates experimentais.

Ao “Laboratório de Nutrição Animal” da Universidade de Brasília (UnB), especialmente à Profa. Dra. Aline Mondini Calil Racanicci, pela orientação e infraestrutura cedida para a realização das análises físicas e de oxidação da carne, e aos seus orientados Cristiane Bovi de Lima, Danniele Leonardi Migotto, João Artêmio Marin Beltrame, Geovana Rocha de Oliveira, Giovana Noletto Soares, Samara Amador, Thais Chiozzini de Souza, Luiza Maria C. S. Ribeiro, Érika Moreira e Pedro Martins, pelo auxílio nas análises e recepção acolhedora em Brasília.

Ao Laboratório de Piscicultura (ESALQ), especialmente ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, pela infraestrutura cedida para realização da análise de explosão respiratória, e aos seus orientados Ricardo Zanon, pelo treinamento da metodologia e atenção dispendida, Brunno da Silva Cerozi, que instigou a inclusão desta análise no projeto, e Fernando Yugo Yamamoto e Rennan Antunes Donadelli, pelo auxílio na realização das análises.

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso do Instituto de Química de São Carlos (USP), pela atenção e pelo estudo de estabilidade de β -ácidos pós-microencapsulação e parceria no estudo do metaboloma da carne.

Aos professores do Departamento de Zootecnia da ESALQ, pela contribuição na minha evolução científica.

Aos professores Siu Mui Tsai e Victor Alexandre Vitorello do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA – USP), pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas.

Aos “irmãos”, Carla de Andrade e Danilo do Prado Perina, por todo auxílio ao longo desta etapa, pelas correções e sugestões nos manuscritos, pelo convívio, amizade e companheirismo.

Aos colegas e amigos do Setor Não Ruminantes Rafaela Pereira, Leonardo Wiliam de Freitas, Gislaine Goretti Romano, Gláucia Samira Napty Komatsu, Cristiano Bortoluzi, Jaqueline Moreira Rafael, Naiara Simarro Fagundes, Kelen Zavarize, Camila Leão e Natália Yumi Yumi Ykeda, pelo auxílio nos abates experimentais, pelo companheirismo durante a jornada de pós-graduação e pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao Cristiano Bortoluzi, pela realização do teste de sensibilidade bacteriana durante seu estágio sanduíche na Purdue University.

Ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade de Santa Cruz (UESC), especialmente à Profa. Dra. Rachel Passos Rezende, pela oportunidade para a realização das análises de PCR-DGGE, e ao seu orientado Eric de Lima Silva Marques, pelo treinamento da metodologia e acompanhamento.

Ao Prof. Dr. Leandro Batista Costa da Pontifícia Universidade Católica (PUC) de Curitiba, pela parceria para a realização das análises na UESC, e aos seus orientados Franz Dias Gois e Pedro Leon Gomes Cairo, pelo auxílio e companheirismo.

Ao “Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal” (ESALQ), especialmente ao Prof. Eduardo Francisquine Delgado (ESALQ), pela ampla visão compartilhada e pelo empréstimo de infraestrutura para realização de análises físicas da carne, e aos seus orientados Daiane Fausto e Marcelo Coutinho, pelo auxílio.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal (ESALQ), especialmente ao Prof. Dr. Raul Machado Neto, pela infraestrutura cedida, e a sua pós-doc Débora Botequio Moretti, pelo treinamento para as leituras das lâminas de histologia.

À estagiária Caroline Batista dos Santos (ESALQ), pelo auxílio nos abates experimentais e pela leitura das lâminas de histologia.

Ao “Laboratório de Nutrição Animal” do Instituto de Zootecnia (IZ), especialmente à Profa. Rosana Aparecida Possenti, pela execução das análises bromatológicas.

Ao “Laboratório de Instrumentação Nuclear” (CENA – USP), especialmente ao técnico Eduardo de Almeida, pela execução das análises de cromo.

Ao “Laboratório de Engenharia de Separações” da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA – USP), especialmente à Profa. Christianne E. C. Rodrigues e a técnica Keila K. Aracava, pelas análises do perfil de ácidos graxos da carne.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ, José Augusto Alves, Ednézio Klimasewski de Souza, Gilberto da Silva Duarte, Mário Aguiar, Antônio Carlos Ladeira, Otávio Birolo de Lara, Alexandre Sebastião Soares, Luis Fernando Rocha, Francisco Messias de Oliveira, Airton Bonato, pela prontidão.

Ao serviço de comut da biblioteca (ESALQ), pela prontidão e eficiência no envio dos artigos.

Ao Eng. Agrônomo Márcio Maranhão, que nos instigou e estimulou a desenvolver o estudo com os β -ácidos do lúpulo.

Aos parceiros das empresas Hopsol e Hopstainer, especialmente aos Srs. Fernando Feitosa, Júlio Landmann e Harald Schwars, que estiveram empenhados na microencapsulação dos β -ácidos do lúpulo e pelo seu fornecimento para este estudo.

Aos meus familiares e amigos, que sempre me incentivaram e apoiaram durante esta árdua jornada e pelos momentos de felicidade que me proporcionam.

Por fim, a todos aqueles que me inspiraram e iluminaram e que contribuíram de alguma forma para a conquista deste “sonho”, meu mais sincero e humilde muito obrigado!

BIOGRAFIA

MAICON SBARDELLA, filho de Vilmar Antônio Sbardella e Elisete Maria Dal' Pizzol Sbardella, nasceu em Concórdia - SC, em 16 de outubro de 1985.

Realizou seu ensino de educação básica no Grupo Escolar Municipal “Maria Melânica Siqueira”, ensino de educação fundamental na Escola de Educação Básica Municipal “Concórdia” e ensino médio na Escola Estadual “São João Batista de La Salle”.

Em fevereiro de 2002, teve seu primeiro registro em carteira de trabalho como Auxiliar de Serviços Gerais, na empresa Funilaria e Refrigeração Sbardella LTDA.

Em março de 2004, ingressou no curso de graduação em Zootecnia no Centro de Educação Superior do Oeste (CEO) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), onde em 19 de julho de 2008 obteve o título de Bacharel em Zootecnia.

No período de julho de 2008 a julho de 2009, atuou junto ao Departamento Técnico da Indústria Agropecuária Santa Cruz (INACRUZ), na cidade de Santa Cruz de La Sierra - Bolívia, com o desenvolvimento de um programa comercial de rações para leitões na fase de creche e com assistência técnica em nutrição e manejo de suínos.

Em julho de 2009, ingressou no curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em “Ciência Animal e Pastagens” da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), onde em 18 de julho de 2011 obteve o título de Mestre em Ciências.

Em julho de 2011, ingressou no curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em “Ciência Animal e Pastagens” da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em andamento.

Durante a maior parte do treinamento de mestrado e doutorado foi bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Em setembro de 2011, ingressou no curso de especialização “MBA em Agronegócios”, para o qual foi agraciado com bolsa de estudos, pelo Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas (PECEGE/ESALQ/USP), onde em setembro de 2013 se submeteu a defesa da monografia.

De fevereiro de 2014 até o presente, vem exercendo a função de Consultor Técnico em Nutrição de Suínos na empresa Cargill Alimentos (Cargill Animal Nutrition).

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Aspectos da nutrição de suínos.....	24
1.1.1 Fisiologia do trato gastrointestinal	24
1.1.2 Microbiota intestinal.....	25
1.1.3 Relação entre desmame, microbiota, nutrição e diarreia pós-desmame.....	26
1.1.4 <i>Status</i> oxidativo e qualidade da carne	27
1.2 Aditivos na alimentação de suínos	29
1.2.1 Antimicrobianos melhoradores do desempenho.....	29
1.2.2 Modificadores de metabolismo	30
1.2.3 Antioxidantes.....	31
1.2.4 β -ácidos do lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>) como potencial aditivo de dietas para suínos.....	32
Referências	33
2 EFEITOS DE β -ÁCIDOS DO LÚPULO (<i>Humulus lupulus</i>) NA DIETA SOBRE O DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS	45
Resumo	45
Abstract.....	45
2.1 Introdução	46
2.2 Material e Métodos	47
2.3 Resultados.....	53
2.4 Discussão	59
2.5 Conclusão	72
Referências	72
3 β -ÁCIDOS DO LÚPULO (<i>Humulus lupulus</i>) NA DIETA DE SUÍNOS REDUZ GORDURA E AUMENTA PROTEÍNA NO MÚSCULO <i>Longissimus</i>	79
Resumo	79
Abstract.....	79

3.1 Introdução	80
3.2 Material e Métodos	81
3.3 Resultados	85
3.4 Discussão	90
3.5 Conclusão.....	93
Referências	93
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
ANEXO.....	101

RESUMO

Utilização de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) em dietas de leitões recém-desmamados

Os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) ou de um antimicrobiano melhorador do desempenho (colistina) na dieta sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e energia da dieta, ocorrência de diarreia, refugagem de leitões, explosão respiratória, peso de órgãos e histologia e diversidade microbiana do intestino de leitões recém-desmamados, assim como testar *in vitro* a sensibilidade de bactérias aos β -ácidos; e (2) avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de β -ácidos na dieta sobre atributos físicos, oxidação lipídica e composição do músculo *Longissimus*. Foram utilizados 200 leitões recém-desmamados ($6,23 \pm 0,32$ kg) em um experimento em blocos completos casualizados com 5 tratamentos, 8 repetições e 5 leitões por unidade experimental (baia). Os leitões foram alimentados com dietas suplementadas com 0 (controle negativo), 120, 240 ou 360 mg/kg de β -ácidos ou com 40 mg/kg de colistina (tratamento antimicrobiano) durante 35 dias. No 7º e 35º dias do experimento, um macho castrado por baia foi sacrificado para avaliação do peso de órgãos (estômago, pâncreas, fígado, intestino delgado e baço), histologia do intestino delgado (altura de vilosidade e profundidade de cripta) e diversidade microbiana do intestino (PCR-DGGE), além da coleta do músculo *Longissimus* para análises da carne. ANOVA e contrastes ortogonais foram utilizados para determinar o efeito dos níveis de β -ácidos na dieta sobre as variáveis, assim como comparar o tratamento antimicrobiano com cada um dos outros tratamentos. O aumento dos níveis de β -ácidos na dieta melhorou linearmente ($P < 0,05$) o peso vivo, o ganho de peso, a eficiência alimentar e a digestibilidade aparente do extrato etéreo da dieta. O tratamento antimicrobiano melhorou ($P < 0,03$) o peso vivo, o ganho de peso e a eficiência alimentar comparado ao controle negativo, porém não afetou ($P > 0,05$) a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o consumo de ração. De maneira geral, a ocorrência de diarreia foi menor ($P < 0,01$) nos tratamentos antimicrobiano, controle negativo e 360 mg/kg de β -ácidos do que nos tratamentos 120 e 240 mg/kg de β -ácidos, enquanto não foram identificados leitões refugos durante todo o período experimental. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre a explosão respiratória no sangue, peso dos órgãos, histologia do intestino delgado e diversidade da microbiota intestinal. Apenas *Staphylococcus aureus* foi sensível aos β -ácidos, enquanto *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim* e *Enterococcus faecalis* foram resistentes. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos níveis de β -ácidos sobre os atributos físicos da carne. Foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) dos β -ácidos sobre os conteúdos de gordura, proteína e TBARS da carne, sendo que os níveis calculados 176, 150 e 181 mg/kg de β -ácidos resultaram, respectivamente, em 16,20% de redução na gordura, 1,95% de aumento da proteína e 23,31% de redução de TBARS. Portanto, a inclusão de β -ácidos do lúpulo até 360 mg/kg na dieta demonstrou ser eficiente como alternativa aos antimicrobianos melhoradores do desempenho, bem como potencial de reduzir gordura, aumentar proteína e prevenir oxidação lipídica da carne.

Palavras-chave: Aditivo; Microbiota; Deposição de Gordura; Desempenho; Suíno

ABSTRACT

Use of β -acids of hops (*Humulus lupulus*) in weanling pig diets

The purposes of this study were: (1) to evaluate the effects of dietary graded levels of hop (*Humulus lupulus*) β -acids or antimicrobial growth promoter (colistin) on growth performance, nutrients and energy digestibility, diarrhea occurrence, unthrifty pigs, respiratory burst, organ weights, small intestine histology, and intestine microbial diversity of weanling pigs, as well as *in vitro* bacteria sensitivity to hop β -acids; and (2) to evaluate the effects of dietary hop β -acids on physical attributes, lipid oxidation, and composition of *Longissimus* muscle. Two hundred weanling pigs (6.23 ± 0.32 kg BW) were used in a randomized complete block design experiment with 5 treatments, 8 replications, and 5 pigs per experimental unit (pen). Pigs were fed diets supplemented with 0 (negative control), 120, 240, or 360 mg/kg hop β -acids, or with 40 mg/kg colistin (antimicrobial treatment) during a 35d. On days 7 and 35 of the experiment, one castrated male from each pen was slaughtered to evaluate organ weights (stomach, pancreas, liver, small intestine, spleen), small intestine histology (villus height and crypt depth), and intestine microbial diversity (PCR-DGGE), as well to sample *Longissimus* muscle for meat analysis. ANOVA and orthogonal contrasts were performed to determine the effects of dietary hop β -acids levels (0, 120, 240, and 360 mg/kg) on all variables, as well as to compare the antimicrobial treatment with all other treatments. Increasing dietary levels of hop β -acids linearly improved ($P < 0.05$) BW, ADG, G:F, and apparent digestibility of ether extract of weanling pig diets. The antimicrobial treatment improved ($P < 0.03$) BW, ADG, and G:F compared to negative control, but did not affect ($P > 0.05$) nutrients and energy digestibility. No effects ($P > 0.05$) of treatments were observed on ADFI. Overall, the diarrhea occurrence was lower ($P < 0.01$) for antimicrobial treatment, negative control, and 360 mg/kg hop β -acids than for 120 and 240 mg/kg hop β -acids, while no unthrifty pigs were identified throughout all experimental period. No effects ($P > 0.05$) of dietary treatments were observed on blood respiratory burst, organ weights, small intestine histology, and intestine microbial diversity. *Staphylococcus aureus* was sensitive, while *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim*, and *Enterococcus faecalis* were resistant to hop β -acids. No effects ($P > 0.05$) of hop β -acids were observed on meat physical attributes. Quadratic effects ($P < 0.05$) of hop β -acids were observed on fat, protein, and TBARS-values of meat, showing that dietary levels of 176, 150 and 181 mg/kg hop β -acids provided, respectively, 16.20% fat reduction, 1.95% protein accretion, and 23.31% TBARS reduction. Therefore, dietary hop (*Humulus lupulus*) β -acids up to 360 mg/kg showed to be efficient as an alternative to antimicrobial growth promoters for weanling pigs, as well to reduce fat, increase protein, and prevent lipid oxidation of meat.

Keywords: Feed additive; Microbiota; Lipid deposition; Performance; Swine

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Estrutura dos componentes da fração β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*)..... 33
- Figura 2.1 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o número de bandas da região V3 (A), Lac1-Lac2 (B) e Lac3-Lac2 (C) no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame. 58
- Figura 2.2 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o perfil de DGGE (A) e diagrama de Venn (B) de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac1-Lac2) no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame..... 62
- Figura 2.3 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o perfil de DGGE (A) e diagrama de Venn (B) de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac3-Lac2) no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame..... 63
- Figura 2.4 - Efeitos dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o perfil de DGGE (A) e diagrama de Venn (B) de bactérias da região V3 do gene 16S no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame. 64
- Figura 2.5 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre a análise de componente principal de bactérias amplificadas com os conjuntos de *primers* Lac1-Lac2 (A), Lac3-Lac2 (B) e região V3 do gene 16S (C) do intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame. 65
- Figura 2.6 - Dendograma UPGMA usando o coeficiência de similaridade de Jaccard de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac1-Lac2) no intestino de leitões (dia 7 e 35 pós-desmame) alimentados com as dietas dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo. 66
- Figura 2.7 - Dendograma UPGMA usando o coeficiência de similaridade de Jaccard de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac3-Lac2) no intestino de leitões (dia 7 e 35 pós-desmame) alimentados com as dietas dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo. 67
- Figura 2.8 - Dendograma UPGMA usando o coeficiência de similaridade de Jaccard de bactérias da região V3 do gene 16S no intestino de leitões (dia 7 e 35 pós-desmame) alimentados com as dietas dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo. 68
- Figura 3.1 - Progressão da oxidação lipídica (TBARS) durante o período de armazenamento refrigerado à 4°C em almôndegas de carne de suínos machos

castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo	89
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição das dietas basais (matéria natural)	48
Tabela 2.2 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta sobre o desempenho zootécnico de leitões recém-desmamados ¹	54
Tabela 2.3 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e da fase de alimentação (pré-inicial 2 ou inicial) sobre a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta de leitões recém-desmamados ¹	55
Tabela 2.4 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e tempo de coleta após o desmame sobre a explosão respiratória no sangue dos leitões recém-desmamados ¹	56
Tabela 2.5 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e do tempo de coleta pós-desmame sobre o peso relativo dos órgãos de leitões recém-desmamados ¹	57
Tabela 2.6 - Efeitos dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e do tempo de coleta pós-desmame sobre a histologia do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de leitões recém-desmamados ¹	60
Tabela 3.1 - Cor (L*, a* e b*), pH, capacidade de retenção de água (CRA), perdas de peso por cozimento (PC) e força de cisalhamento (FC) do músculo <i>Longissimus</i> de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dia ^a	86
Tabela 3.2 - Conteúdo de umidade (UM), gordura (GB) e proteína (PB) das almôndegas de carne de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias nos dias 0 e 8 do ensaio de armazenamento refrigerado ^a	86
Tabela 3.3 - Perfil de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) (% do total de ácidos graxos) de almôndegas de carne de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias nos dias 0 e 8 do ensaio de armazenamento refrigerado ^a	88
Tabela 3.4 - Perfil de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) das almôndegas de carne de suínos machos castrados alimentados, com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias no dia 0 e 8 do ensaio de armazenamento refrigerado ^a	88
Tabela 3.5 - Produtos secundários da oxidação lipídica, mensurados como TBARS (mg de MDA/kg de carne) durante armazenamento refrigerado à 4°C, em almôndegas de carne crua e pré-cozidas de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo ^a	89

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína animal de maior consumo *per capita* no mundo. Na cadeia produtiva da carne suína, o período imediatamente após o desmame e a manutenção das propriedades físico-químico-sensoriais da carne suína têm sido considerados fatores críticos. O período imediatamente após o desmame é marcado pela limitada capacidade de digestão de alimentos e absorção de nutrientes, anorexia, diarreia e reduzida taxa de crescimento (BIAGI et al., 2007; LALLÈS et al., 2007; MARION et al., 2002). Este cenário tem sido associado a reações de hipersensibilidade na mucosa intestinal, aumento da taxa de renovação do epitélio intestinal, alterações da microbiota intestinal, ativação do sistema imune e estresse oxidativo (BOUDRY et al., 2004; LAURIDSEN, 2010; MILLER et al., 1988; MOLLY, 2001; NABUURS, 1993a, 1993b; PLUSKE et al., 1996, 1997; REID et al., 2003; WU et al., 2004). Adicionalmente, a carne suína é altamente susceptível à oxidação lipídica (YI et al., 2013), sendo este um dos fatores mais importantes no processo de deterioração da carne (MORRISSEY et al., 1998), além de possuir efeito negativo para a saúde dos consumidores (ANGELI et al. 2011; VERBEKE et al., 1999). Como estratégia nutricional para contornar tais desafios da cadeia produtiva de suínos, aditivos tem sido amplamente utilizados na alimentação dos suínos, tais como: antimicrobianos melhoradores do desempenho para melhorar a saúde animal e o desempenho zootécnico; modificadores do metabolismo para aumentar a eficiência alimentar e reduzir a deposição de gordura corporal (ALMEIDA et al., 2013; KUTZLER et al., 2011); e antioxidantes para aumentar o *status* antioxidante do organismo e da carne (LAHUCKY et al., 2010; ROSSI et al., 2013). Entretanto, inquietações quanto à segurança alimentar de tais aditivos sintéticos (KARRE et al., 2013) tem levado a uma crescente demanda por produtos oriundos de criações livres destes aditivos. Desta forma, o “apelo” para o desenvolvimento de aditivos “naturais” tem sido crescente.

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.; Cannabaceae) possui uma grande diversidade de metabólitos secundários com propriedades funcionais, anti-inflamatórias, antioxidantes e contra doenças relacionadas ao estilo de vida (BIENDL; PINZL, 2008; GERHAUSER et al., 2002). Os β -ácidos do lúpulo têm apresentado efeito melhorador do desempenho em frangos de corte (BOZKURT et al., 2009; CORNELISON et al., 2006), demonstrando atividade antimicrobiana contra *Clostridium perfringens* no intestino (SIRAGUSA et al., 2008; TILLMAN et al., 2011). *In vitro*, mudanças na população microbiana do rúmen também têm

sido induzidas pelos β -ácidos do lúpulo (NARVAEZ et al., 2011, 2013; WANG et al., 2010), assim como α - e β -ácidos do lúpulo têm demonstrado atividade antioxidante (TAGASHIRA et al., 1995; van HOYWEGHEN et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2009). Adicionalmente, os α -ácidos do lúpulo têm demonstrado afetar o metabolismo lipídico pelo aumento da β -oxidação de ácidos graxos no fígado (SHIMURA et al., 2005) e redução do diâmetro de adipócitos e peso do tecido adiposo em camundongos (SUMIYOSHI; KIMURA, 2013; YAJIMA et al., 2004). As propriedades sendo atribuídas aos β -ácidos do lúpulo também incluem antiviral (BUCKWOLD et al., 2004), anti-inflamatória (CLEEMPUT et al., 2009; TANG et al., 2011), antidepressivo (ZANOLI et al., 2005) e anticâncer (LAMY et al., 2007). Entretanto, não existe informação científica disponível sobre os efeitos dos β -ácidos do lúpulo como potencial aditivo de dietas para suínos.

Os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar os efeitos da inclusão de β -ácidos do lúpulo ou de um antimicrobiano melhorador do desempenho (colistina) na dieta sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e energia, ocorrência de diarreia, refugagem de leitões, explosão respiratória, peso de órgãos, histologia intestinal e diversidade da microbiota intestinal de leitões recém-desmamados, além da sensibilidade bacteriana *in vitro* aos β -ácidos do lúpulo; e (2) avaliar os efeitos da inclusão de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre atributos físicos, oxidação lipídica e composição do músculo *Longissimus*.

1.1 Aspectos da nutrição de suínos

1.1.1 Fisiologia do trato gastrintestinal

O trato gastrintestinal tem um papel importante na aquisição de nutrientes e defesa imune dos animais. A diferenciação e a funcionalidade das células epiteliais do intestino, resultados da interação entre conteúdo intestinal (alimentos e microbiota) e sistema imune, consistem no principal mecanismo para a defesa do organismo contra patógenos e para os processos de digestão e absorção (DIECKGRAEFE et al., 2000; HOOPER et al., 2001). Em suínos neonatos, a capacidade de produção e secreção de ácido clorídrico e enzimas digestivas (JENSEN; JENSEN; JAKOBSEN, 1997; WESTRÖM, 1997), assim como a concentração de macrófagos e linfócitos na mucosa intestinal (GASKINS; KELLEY, 1995; ROTHKOTTER et al., 1991), são limitadas. Devido à estrutura placentária, durante a fase fetal os leitões não recebem estímulo antigênico do meio externo, nem anticorpos maternos (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 1994). Desta forma, o muco (fator extrínseco) e a mucosa (fator intrínseco) agem como a principal barreira de defesa dos neonatos contra compostos nocivos

(GASKINS, 1998). Entretanto, como resposta adaptativa aos estímulos do ambiente, estas limitações são gradativamente superadas durante o desenvolvimento neonatal dos leitões.

A taxa de renovação da mucosa intestinal é determinada pelo equilíbrio entre a proliferação celular nas criptas, diferenciação celular nas criptas e ao longo dos vilos, e perda celular no ápice dos vilos (MAIORKA, 2002). Durante o período de amamentação, são observadas vilosidades muito longas e criptas não tão profundas. Isto ocorre porque a descamação no ápice dos enterócitos é mínima e a taxa de proliferação celular na cripta é suficiente para substituir os enterócitos na mesma velocidade da descamação. Por ocasião do desmame, observa-se o aparecimento de vilosidades deformadas e redução da altura das vilosidades, do número de enterócitos maduros e da atividade enzimática na borda em escova, além de aumento da profundidade das criptas (McCRAKEN et al., 1999; MOLLY, 2001; PLUSKE et al., 1997; WU et al., 2004) e da espessura da lâmina própria (DUNSFORD et al., 1989). Tais alterações têm sido associadas à redução da capacidade digestiva e absorviva do intestino e do aproveitamento dos nutrientes da dieta (LEE et al., 2000; MAVROMICHALIS et al., 2001; McCRAKEN et al., 1999; MILLER et al., 1986). As modificações da estrutura do epitélio intestinal observadas imediatamente após o desmame estão diretamente relacionadas à mudança abrupta da dieta líquida (leite) para sólida (à base de ingredientes vegetais), a qualidade dos ingredientes da dieta, a intolerância aos antígenos presentes nos ingredientes e a quantidade de ração consumida (LEE et al., 2000; LI et al., 1991; MAVROMICHALIS et al., 2001; PLUSKE et al., 1997). Estima-se que cerca de 20% da energia ingerida pelos animais seja utilizada para a manutenção do trato gastrointestinal, especialmente para a proliferação celular na mucosa, produção e secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (McBRIDE; KELLY, 1990). Desta forma, a manutenção das condições intestinais é essencial para a saúde e desenvolvimento dos leitões na fase imediatamente após o desmame.

1.1.2 Microbiota intestinal

O equilíbrio da microbiota intestinal é um fator essencial para a saúde intestinal (BAUER et al., 2006; KELLEY; COUTTS, 2000). A relação microbiota-hospedeiro é considerada uma interação simbiótica, onde os microrganismos contribuem para a fisiologia do hospedeiro e, por sua vez, se beneficiam das condições ambientais e disponibilidade de nutrientes no trato gastrointestinal do hospedeiro. A microbiota intestinal é formada por bactérias transientes, que residem temporariamente, e por bactérias indígenas (comensais), que colonizam permanentemente o trato gastrointestinal (KELLY, 2004). Durante a fase de aleitamento, o equilíbrio da microbiota é mantido devido à atividade antimicrobiana de

componentes do leite (KELLEY; COUTTS, 2000). Entretanto, no período pós-desmame, a microbiota intestinal pode ser muito variável (PEDROSO et al., 2005), sendo que os nutrientes não absorvidos podem servir de substrato para bactérias patogênicas, propiciando sua colonização no trato digestório e a ocorrência de diarreias (TZIPORI et al., 1980). Como consequência, ocorre aumento da translocação de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, estímulo para a ativação do sistema imune e redirecionamento de nutrientes para a função de defesa (JOHNSON; ESCOBAR; WEBEL, 2001; LALLÈS et al., 2004; ZAREIE et al., 2006).

A manutenção das condições de equilíbrio intestinal é resultado da complexa interação entre nutrientes, compostos exógenos e microbiota, além de elementos genéticos do hospedeiro. Esta interação contribui para a diferenciação e funcionalidade das células e do tecido intestinal. A microbiota induz um padrão complexo de expressão gênica no intestino (HOOPER et al., 2001), afetando a expressão de genes envolvidos em funções intestinais como absorção de nutrientes, barreira mucosa e maturação intestinal. As bactérias comensais desempenham importante papel no desenvolvimento de órgãos, tecidos e sistema imune, assim como no fornecimento de nutrientes (GASKINS, 2001; SNEL et al., 2002). Em animais *germ-free*, foi observado um reduzido desenvolvimento de células do sistema imune na lâmina própria comparado com animais criados de forma convencional (EKINO et al., 1980; ROTHKOTTER et al., 1994; SCHAFFNER et al., 1974; UMESAKI et al., 1999). O desequilíbrio da microbiota intestinal tem sido associado a quadros de inflamação intestinal e estresse oxidativo, uma vez que as células fagocitárias produzem elevadas quantidades de radicais livres para eliminar microrganismos invasores (STOREY, 1996).

1.1.3 Relação entre desmame, microbiota, nutrição e diarreia pós-desmame

A diarreia pós-desmame é considerada uma síndrome multifatorial, tendo sido atribuída principalmente ao desmame e a bactérias patogênicas. Mesmo que microrganismos patogênicos como *Escherichia coli* e rotavírus sejam considerados os principais responsáveis pela ocorrência da diarreia pós-desmame em leitões (NABUURS et al., 1993a), tais microrganismos patogênicos têm sido também isolados em intestinos de leitões saudáveis (HAMPSON, 1985; NABUURS et al., 1993a). Além disso, a inoculação via oral de microrganismos considerados patogênicos tem frequentemente falhado na indução de diarreia em animais sadios (HAMPSON, 1994). Em leitões com diarreia tem sido observada redução da altura de vilosidades e aumento da profundidade de criptas (NABUURS et al., 1993a, 1993b), redução do número de células absorptivas e aumento do número de células secretoras, além de aumento da secreção intestinal (CERA et al., 1988). Os alimentos não digeridos e

nutrientes não absorvidos exercem pressão osmótica para o lúmen intestinal e servem de substrato para a proliferação de microrganismos (HAMPSON, 1994). Nabuurs et al. (1994) demonstraram que a absorção de fluidos e eletrólitos é menor em leitões infectados com *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) que nos não infectados e também menor em animais infectados com ETEC e desmamados que animais infectados com ETEC e não desmamados. Assim, parece que o desmame associado às alterações da dinâmica do fluxo de água e eletrólitos são fatores determinantes para o início da diarreia. Esta condição cria um ambiente favorável para a proliferação bacteriana, que exerce um efeito agravante no processo da diarreia pós-desmame. Tem sido observado que o aumento de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular da *Escherichia coli* diminui a altura e área das vilosidades intestinais e aumenta a profundidade das criptas (PARRA et al., 2011), aumentando a predisposição para infecção por outros agentes patogênicos. Este aumento das populações de *Escherichia coli* após o desmame também é favorecido, possivelmente, pela redução de lactobacilos, que eram predominantes no estômago e intestino de leitões antes do desmame (AMADOR et al., 2007).

1.1.4 Status oxidativo e qualidade da carne

A produção mitocondrial de ATP consiste basicamente da oxidação do H_2 para a formação de H_2O , sendo a principal via de produção de energia da célula animal. Cerca de 90% do O_2 absorvido é utilizado pela mitocôndria e quase sua totalidade ($\approx 98\%$) forma H_2O na cadeia respiratória (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No entanto, parte do O_2 consumido (1 a 4%) é convertida em O_2^- (superóxido) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) devido à perda de elétrons na mitocôndria (KONSTANTINOV et al., 1987; TURRENS et al., 1982), podendo dar origem a radicais OH^- (hidroxila) (KLEINVELD et al., 1989). Coletivamente, estes compostos são conhecidos como radicais livres (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002; STOREY, 1996). Radical livre é qualquer átomo ou molécula com existência independente e que contenha um ou mais elétrons não pareados ocupando sozinho o seu orbital atômico ou molecular mais externo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WEISS; MAHAN, 2008), o que lhe confere alta reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Em sistemas biológicos, os radicais livres reagem com elétrons de biomoléculas como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos na tentativa de se estabilizarem (removendo um elétron ou doando o elétron não pareado), modificando a forma e a função destas biomoléculas (KLEINVELD et al., 1989) e podendo gerar novos radicais em uma reação em cadeia.

No organismo, além da produção durante o processo de oxidação, os radicais livres podem ser produzidos de forma mais intensa durante alguma disfunção biológica, como em condições de estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999) e processos inflamatórios (BABIOR, 2000), ou serem provenientes dos alimentos. Portanto, o organismo constantemente se utiliza de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, que formam o sistema antioxidante, para se defender dos efeitos tóxicos dos radicais livres. As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase metabolizam os radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), enquanto moléculas com capacidade de doar hidrogênio ou elétron como o α -tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico estabilizam os radicais livres (YU, 1994). Entretanto, em determinadas condições as defesas antioxidantes do organismo podem ficar sobrecarregadas (STOREY, 1996), podendo haver injúrias histológicas e fisiológicas e até morte celular nos diversos tecidos do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HARRELL et al., 2008; STOREY, 1996; WEISS; MAHAN, 2008; WELCH et al., 2002), caracterizando o estresse oxidativo.

Na fase pós-desmame de leitões, as concentrações séricas de diversos antioxidantes (por exemplo, α -tocoferol) diminuem acentuadamente (LAURIDSEN, 2008, 2010; WEISS; MAHAN, 2008), quadro agravado devido à ativação imune, estresse ambiental, elevada taxa de crescimento e ingredientes da dieta. As membranas das células e organelas, que contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (fosfolipídios), são alvos de radicais livres (principalmente OH $\cdot$). Na carne suína, o ataque de radicais livres aos ácidos graxos pode desencadear o processo de peroxidação lipídica através da formação de radicais peroxila (fase de ativação), que aceleram o processo de peroxidação (fase de propagação) e resultam na formação de peróxidos, tais como o 4-hidroxinonenal, isoprostanos e malondialdeído (MDA) (fase de término). O processo de oxidação da membrana celular reduz a fluidez da membrana, podendo levar ao seu rompimento e, conseqüentemente, favorecendo as perdas de água. Adicionalmente, os radicais livres podem oxidar outros componentes celulares, como as proteínas que liberam sua água aderida. A mioglobina é o principal pigmento associado com a cor da carne, sendo que o estado de oxidação do ferro no grupo prostético heme da mioglobina e o tipo de ligante associado ao ferro, são responsáveis pelas mudanças estruturais do pigmento e reações de cor. Assim, a descoloração da carne associada aos processos de oxidação está relacionada à conversão da oximioglobina à metamioglobina pela liberação de oxigênio, que catalisa o processo oxidativo.

1.2 Aditivos na alimentação de suínos

1.2.1 Antimicrobianos melhoradores do desempenho

O mecanismo de ação dos antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) melhoradores do desempenho não é totalmente elucidado. A hipótese mais aceita pela comunidade científica é que os antimicrobianos em doses subterapêuticas atuem modificando a microbiota intestinal de forma direta (MELLOR, 2000) e, desta forma, afetam positivamente a fisiologia do trato gastrointestinal e o desempenho dos animais (DIBNER; RICHARDS, 2005; NIEWOLD, 2007). Esta teoria é suportada pela observação de que animais *germ-free* não apresentam quaisquer efeitos sobre o crescimento em resposta aos antimicrobianos melhoradores do desempenho (COATES et al., 1963). Portanto, postula-se que os antimicrobianos atuem: (1) causando morte e/ou redução de microrganismos patogênicos e, consequentemente, reduzindo a produção de toxinas nocivas ao epitélio intestinal; (2) reduzindo a competição por nutrientes entre microrganismos e hospedeiro; (3) aumentando a síntese de vitaminas e outros fatores de crescimento; (4) aumentando a digestão de alimentos e absorção de nutrientes; (5) reduzindo a taxa de renovação dos enterócitos e a motilidade intestinal; e (6) aumentando a eficiência energética do intestino (KNARREBORG et al., 2004; SMIRNOV et al., 2005). O resultado disso é a melhora da saúde, crescimento e conversão alimentar dos animais. Entretanto, limitações desta teoria incluem fatos como: a dose subterapêutica de antimicrobiano seria insuficiente para provocar modificações da microbiota (uma vez que é inferior à concentração inibitória mínima); e, embora diferentes espécies animais apresentem diferentes microbiotas intestinais, as espécies animais respondem de forma similar aos antimicrobianos melhoradores do desempenho, indicando um mecanismo de ação comum.

Uma nova abordagem sugerindo um mecanismo de ação anti-inflamatório dos antimicrobianos melhoradores do desempenho tem sido proposta. Esta teoria está suportada na evidência de que antimicrobianos poderiam ser absorvidos como consequência do aumento da permeabilidade intestinal induzida pela inflamação (MacDONALD; MONTELEONE, 2005) e acumulados em células inflamatórias fagocitárias (NIEWOLD et al., 2000). O acúmulo de antimicrobianos em células inflamatórias presentes no epitélio intestinal atenuaria a resposta inflamatória através da redução de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo o estímulo catabólico e redirecionando nutrientes para o crescimento (GRUYS et al., 2006). Portanto, esta abordagem sugere um mecanismo de ação anti-inflamatório (e não necessariamente antibiótico) para os antimicrobianos melhoradores do desempenho

(NIEWOLD, 2007). Assim, a limitada resposta inflamatória em intestinos saudáveis poderia explicar a falta de resposta de animais *germ-free* aos antimicrobianos melhoradores do desempenho, bem como o fato de seus efeitos serem mais evidentes em condições de elevado desafio. Costa et al. (2011) demonstraram que uma dose subterapêutica de clorotetraciclina fornecida para camundongos inoculados com *Clostridium rodentium* resistente à tetraciclina não afetou a densidade de *Clostridium rodentium* e tampouco a microbiota do intestino. Porém, reduziu a transcrição de citocinas inflamatórias e a perda de peso associada à infecção, indicando que, possivelmente, a hipótese de ação anti-inflamatória seja válida.

Por princípio de precaução, o uso de antimicrobianos melhoradores do desempenho tem sido restringido e/ou banido da produção animal. O motivo para tal restrição se deve à possibilidade destes atuarem na seleção de microrganismos resistentes, deixarem resíduos na carcaça e impactarem negativamente a antibioticoterapia humana (BEDFORD, 2000; MELLOR, 2000). Entretanto, a retirada dos antimicrobianos melhoradores do desempenho na criação intensiva de suínos (onde há grande desafio por contaminação) tem sido associada ao aumento no custo de produção e no uso de antimicrobianos para o tratamento de doenças com sintomatologia clínica. Neste contexto, pesquisas têm sido direcionadas para a busca de aditivos alternativos aos antimicrobianos melhoradores do desempenho, especialmente com enfoque na manipulação da microbiota intestinal (prebióticos, probiótico, simbióticos, extratos vegetais, etc.). Entretanto, diferentemente dos antimicrobianos que têm apresentado resultados consistentes sobre o desempenho dos animais, tais aditivos alternativos têm demonstrado resultados inconsistentes (GASKINS et al., 2002; NIEWOLD, 2006). Com base na proposta de ação anti-inflamatória, novos enfoques deveriam ser adotados na pesquisa de aditivos alternativos com possível ação moduladora da resposta inflamatória ao invés de ação antimicrobiana.

1.2.2 Modificadores de metabolismo

Os aditivos modificadores de metabolismo têm sido utilizados para aumentar a taxa de deposição proteica em detrimento da deposição de gordura na carcaça (BOLER et al., 2010), além de melhorar a eficiência alimentar em suínos (HINSON et al., 2011; RIKARD-BELL et al., 2009). A ractopamina é o aditivo repartidor de nutriente mais utilizado na alimentação de suínos. A ractopamina se liga aos receptores β -adrenérgicos acoplados a proteína G presentes na membrana plasmática das células, desencadeando a cascata de resposta celular via conversão da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (cAMP) que, por sua vez, ativa a proteína kinase A que, por fosforilação, ativa outras enzimas (ALBERTS et

al., 2004). Os principais resultados disso são: (1) o aumento da massa muscular devido à hipertrofia das células musculares (aumento da síntese e redução da degradação proteica); (2) aumento do fluxo sanguíneo no músculo esquelético, aumentando o suprimento de nutrientes e energia; e (3) aumento da lipólise (aumentando liberação de glicerol e ácidos graxos livres) e redução da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos nos adipócitos (antagoniza insulina e suprime atividade de enzimas) (MERSMANN, 1998; PETERLA; SCANES, 1990). Entretanto, a exposição prolongada à ractopamina reduz a intensidade de resposta celular, processo conhecido como dessensitização, através do desacoplamento dos receptores de suas proteínas G e da internalização e degradação de receptores (ALBERTS et al., 2004). Em suínos, foi demonstrado que a exposição prolongada reduz progressivamente a presença de receptores nos tecidos (SPURLOCK et al., 1994; LIU et al., 1994). Desta forma, tem sido observado que a máxima resposta em desempenho ocorre no início da suplementação da ractopamina e diminui com o aumento do tempo de exposição (MILLS, 2002; WILLIAMS et al., 1994).

O consumo de energia e a relação lisina-energia são fatores que podem afetar a resposta dos suínos à ractopamina (APPLE et al., 2004, 2008; HINSON et al., 2011; SCHINCKEL et al., 2002, 2003; WILLIAMS et al., 1994). Embora os efeitos da ractopamina sobre o desempenho e a eficiência alimentar dos suínos reportados pela literatura tenham sido bastante consistentes, os efeitos sobre a qualidade da carne tem variado. Carr et al. (2005a, 2009) não detectaram quaisquer efeitos sobre o pH, perda de água e coloração da carne, enquanto que redução de perda de água e descoloração da carne foi observado por outros autores (ALMEIDA et al., 2010; APPLE et al., 2008; KUTZLER et al., 2010). Além disso, aumento na força de cisalhamento tem sido observado (CARR et al., 2005a, b).

A presença de resíduos em tecidos de animais alimentados com ractopamina (QIANG et al., 2007; SMITH; SHELVER, 2002) tem levado a questionamentos quanto à segurança de seu uso. Indícios de intoxicação têm levado a proibição do uso de ractopamina em alguns países (incluindo a União Europeia), embora seu uso seja legalizado em diversos países (incluindo EUA, Canada e Brasil).

1.2.3 Antioxidantes

Devido ao elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (SHAHIDI; PEGG, 1994), a carne suína é altamente susceptível à oxidação lipídica. No *ranking* de susceptibilidade à oxidação lipídica (YI et al., 2013), a carne suína é considerada a segunda, ficando atrás apenas da carne de frango. A oxidação lipídica é um dos fatores mais

importantes no processo de deterioração da carne, afetando suas características nutricionais e sensoriais (MORRISSEY et al., 1998), e possuindo efeito negativo para a saúde dos consumidores (ANGELI et al., 2011; VERBEKE et al., 1999). Antioxidantes têm sido adicionados às dietas com a finalidade de aumentar as reservas de antioxidantes no organismo animal e prevenir o estresse oxidativo e o processo de oxidação lipídica da carne, conforme descrito no item anterior.

1.2.4 β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) como potencial aditivo de dietas para suínos

O lúpulo é uma planta trepadeira perene, nativa da Europa, Ásia e América do Norte, cultivado predominantemente no hemisfério norte onde o fotoperíodo é favorável. As flores do lúpulo contêm compostos com propriedades funcionais que têm sido aplicados na medicina tradicional (SAKAMOTO; KONINGS, 2003; ZUURBIER et al., 1995), dentre eles os α -ácidos e β -ácidos. Os α -ácidos (humulones) e seus isômeros solúveis em água (cohumulone, adhumulone) e os iso- α -ácidos (isohumulones) são utilizados como preservadores na indústria cervejeira, sendo os principais componentes do sabor amargo da cerveja (SAKAMOTO; KONINGS, 2003). Os β -ácidos (lupulone) e seus congêneres (adlupulone, colupulone, prelupulone, postlupulone e adprelupulone) têm demonstrado atividade antimicrobiana (SRINIVASAN et al., 2004), antioxidante (van HOYWEGHEN; BIENDL; HEYERICK, 2010) e anti-inflamatória (CLEEMPUT et al., 2009). Os β -ácidos possuem uma estrutura alicíclica de 2,4-ciclohexadieno (Figura 1.1).

Os β -ácidos do lúpulo têm demonstrado potencial de ação melhoradora do desempenho em frangos de corte (BOZKURT et al., 2009; CORNELISON et al., 2006). A inclusão de 220 ppm de extrato de lúpulo (0,6% de α -ácidos e 9,3% de β -ácidos) em dietas de frangos de corte demonstrou aumentar a taxa de crescimento (66,14 vs 67,54 g/dia) e melhorar a conversão alimentar (1,72 vs 1,67), no entanto, abaixo da taxa de crescimento (68,86 g/dia) e conversão alimentar (1,61) de frangos alimentados com dietas contendo 50 ppm de penicilina (CORNELISON et al., 2006). Os β -ácidos foram eficazes no controle da proliferação de *Clostridium perfringens* no intestino de frangos de corte inoculados (SIRAGUSA et al., 2008; TILLMAN et al., 2011). Além disso, foi demonstrado *in vitro* que o extrato de lúpulo inibiu o crescimento de bactérias indesejáveis e reduziu a produção de amônia no rúmen, podendo melhorar as condições de fermentação ruminal e gliconeogênese (FLYTHER, 2009). Entretanto, até o momento, não há na literatura estudos utilizando β -ácidos do lúpulo em dietas para suínos.

Figura 1.1 - Estrutura dos componentes da fração β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*)

Adaptado de Siragusa et al. (2008).

Referências

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Comunicação celular. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo: Artmed; 2004. cap. 15, p. 831-906.
- ALMEIDA, V.V.; NUÑEZ, A.J.C.; SCHINCKEL, A.P.; ANDRADE, C.; BALIEIRO, J.C.C.; SBARDELLA, M.; MIYADA, V.S. Time-response relationship of ractopamine feeding on growth performance, plasma urea nitrogen concentration, and carcass traits of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 811-818, 2013.
- ALMEIDA, V.V.; BERENCHTEIN, B.; COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; BRAZ, D.B.; MIYADA, V.S. Ractopamina, cromo-metionina e suas combinações como aditivos modificadores do metabolismo de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 1969-1977, 2010.
- APPLE, J.K.; MAXWELL, C.V.; BROWN, D.C.; FRIESEN, K.G.; MUSSER, R.E.; JOHNSON, Z.B.; ARMSTRONG, T.A. Effects of dietary lysine and energy density on performance and carcass characteristics of finishing pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 3277-3287, 2004.
- APPLE, J.K.; MAXWELL, C.V.; KUTZ, B.R.; RAKES, L.K.; SAWYER, J.T.; JOHNSON, Z.B.; ARMSTRONG, T.A.; CARR, S.N.; MATZAT, P.D. Interactive effect of ractopamine and dietary fat source on pork quality characteristics of fresh pork chops during simulated retail display. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 2711-2722, 2008.

AMADOR, P.; GARCÍA-HERRERA, J.; MARCA, M.C.; OSADA, J. de la; ACÍN, S.; NAVARRO, M.A.; SALVADOR, M.T.; LOSTAO, M.P.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M.J.. Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 2153, p. 125-133, 2007.

ANGELI, J.P.; GARCIA, C.C.; SENA, F.; FREITAS, F.P.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P. Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 51, p. 13, 2011.

BABIOR, B.M. The NADPH oxidase of endothelial cells. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 50, p. 267–269, 2000.

BAUER, E.; WILLIAMS, B.; SMIDT, H.; VERSTEGEN, M.; MOSENTHIN, R. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 7, p. 35-51, 2006.

BEDFORD, M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 56, p. 348-365, 2000.

BIAGI, G.; PIVA, A.; MOSCHINI, M.; VEZZALI, E.; ROTH, F.X. Performance, intestinal microflora, and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 1184-1191, 2007.

BIENDL, M.; PINZL, C. **Hops and Health**. Germany: Deutsches Hopfenmuseum, 2008. 123 p.

BOLER, D.D.; HOLMER, S.F.; DUNCAN, D.A.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; STITES, C.R.; PETRY, D.B.; HINSON, R.B.; ALLEE, G.L.; McKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Fresh meat and further processing characteristics of ham muscles from finishing pigs fed ractopamine hydrochloride. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 210-220, 2010.

BOUDRY, G.; PÉRON, V.; LE HUEROU-LURON, I.; LALLÈS, J. P.; SÈVE, B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglets intestine. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 2256-2262, 2004.

BOZKURT, M.; KÜÇÜKYILMAZ, K.; ÇATLI, A.U.; ÇINAR, M. Effect of dietary mannan oligosaccharide with or without oregano essential oil and hop extract supplementation on the performance and slaughter characteristics of male broilers. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 39, p. 223-232, 2009.

BUCKWOLD, V.E.; WILSON, R.J.H.; NALCA, A.; BEER, B.B.; VOSS, T.G.; TURPIN, J.A.; BUCKHEIT, R.W.; WEI, J.; WENZEL-MATHERS, M.; WALTON, E.M.; SMITH, R.J.; PALLANSCH, M.; WARD, P.; WELLS, J.; CHUVALA, L.; SLOANE, S.; PAULMAN, R.; RUSSELL, J.; HARTMAN, T.; PTAK, R. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 61, p. 57-62, 2004.

- CARR, S.N.; RINCKER, P.J.; KILLEFER, J.; BAKER, D.H.; ELLIS, M.; MCKEITH, F.K. Effects of different cereal grains and ractopamine hydrochloride on performance, carcass characteristics, and fat quality in late-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 223-230, 2005a.
- CARR, S.N.; IVERS, D.J.; ANDERSON, D.B.; JONES, D.J.; MOWREY, D.H.; ENGLAND, M.B.; KILLEFER, J.; RINCKER, P.J.; MCKEITH, F.K. The effects of ractopamine hydrochloride on lean carcass yields and pork quality characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 2886-2893, 2005b.
- CARR, S.N.; HAMILTON, D.N.; MILLER, K.D.; SCHROEDER, A.L.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, D.; KILLEFER, J.; ELLIS, M.; MCKEITH, F.K. The effect of ractopamine hydrochloride (Paylean) on lean carcass yields and pork quality characteristics of heavy pigs fed normal and amino acid fortified diets. **Meat Science**, Amsterdam, v. 81, p. 533-539, 2009.
- CERA, K.R.; MAHAN, D.C.; CROSS, R.F.; REINHART, G.A.; WHITMOYER, R.E. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 574-584, 1988.
- CLEEMPUT, M.V.; CATTOOR, K.; DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D.; HEYERICK, A. A. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 72, p. 1220-1230, 2009.
- COATES, M.E.; FULLER, R.; HARRISON, G.F.; LEV, M.; SUFFOLK, S.F. Comparison of the growth of chicks in the Gustafsson *germ-free* apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 17, p. 141-151, 1963.
- CORNELISON, J.M.; YAN, F.; WATKINS, S.E.; RIGBY, L.; SEGAL, J.B.; WALDROUP, P.W. Evaluation of Hops (*Humulus lupulus*) as an antimicrobial in broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 5, p. 134-136, 2006.
- COSTA, E.; UWIERA, R.R.E.; KASTELIC, J.P.; SELINGER, L.B.; INGLIS, G.G. Non-therapeutic administration of a model antimicrobial growth promoter modulates intestinal immune responses. **Gut Pathogens**, London, v. 3, p.14, 2011.
- DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, Oxford, v. 84, p. 634-643, 2005.
- DIECKGRAEFE, B.K.; STENSON, W.F.; KORZENIK, J.R.; SWANSON, P.E.; HARRINGTON, C.A. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 4, p. 1-11. 2000
- DUNSFORD, B.R.; KNABE, D.A.; HAENSLY, W.E. Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early weaned pig. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 1855-1863, 1989.

- EKINO, S. NAWA, Y.; TANAKA, K.; MATSUNO, K.; FUJII, H.; KOTANI, M. Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 58, p. 289-296, 1980.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FLYTHE, M.D. The antimicrobial effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 48, p. 712-717, 2009.
- GASKINS, H.R. Immunological development and mucosal defence the pig intestine. In: WISEMAN, J.; VARLEY, M.A.; CHADWICK, J.P. (Ed.). **Progress in pig science**. Nottingham: Nottingham University Press, 1998. chap. 5, p. 81-102.
- GASKINS, H.R.; KELLEY, K.W. Immunology and neonatal mortality. In: VARLEY, M.A. (Ed.). **The neonatal pig: Development and survival**. Wellingford: CAB Internacional, 1995. chap. 6, p. 39-55.
- GASKINS, H.R. Intestinal bacteria and their influence on swine growth. In: LEWIS, A.J.; SOUTHERN, L.L. (ed.). **Swine Nutrition**. 2.ed. Nebraska: CRC Press, 2001. chap. 26, p. 585-608.
- GASKINS H.R.; COLLIER, C.T.; ANDERSON, D.B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, p. 29-42, 2002.
- GERHAUSER, C.; ALT, A.; HEISS, E.; GAMAL-ELDEEN, A.; KLIMO, K.; KNAUFT, J.; NEUMANN, I.; SCHERF, H.R.; FRANK, N.; BARTSCH, H.; BECKER, H. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 1, p. 959-969, 2002.
- GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J.; VAN DIJK, E.; MELOEN, R.H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, Amsterdam, v. 108, p. 229-232, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd .ed. Oxford: Clarendon Press, 1999. 543 p.
- HAMPSON, D.J. Postweaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. In: GILES, C.L. (Ed.). **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994.
- HAMPSON, D.J.; HINTON, M.; KIDDER, D.E. Coliform numbers in the stomach and small intestine of healthy pigs following weaning at three weeks of age. **Journal of Comparative Pathology**, Amsterdam, v. 95, p. 353-362, 1985.
- HARRELL, R.J.; ANDREWS, J.; ROBINSON, V.; VAZQUEZ-ANON, M.; CARTER, S. Synthetic antioxidant applications in nonruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 384, 2008.

- HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 133, p. 537-556, 2002.
- HINSON, R.B.; WIEGAND, B.R.; RITTER, M.J.; ALLEE, G.L.; CARR, S.N. Impact of dietary energy level and ractopamine (Paylean) on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 3572-3579, 2011.
- HOOPER, L.; WONG, M.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P.; GORDON, J. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, Washington, v. 291, p. 881-884, 2001.
- JENSEN, M.S.; JENSEN, S.K.; JAKOBSEN, K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 437-445, 1997.
- JOHNSON, R.W.; ESCOBAR, J.; WEBEL, D.M. Nutrition and Immunology of Swine. In: LEWIS, A.J.; SOUTHERN, L.L. **Swine Nutrition**. 2.ed. Nebraska: CRC Press, 2001. chap. 24, p. 545-562.
- KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K.J.K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, Amsterdam, v. 94, p. 220-227, 2013.
- KELLEY, D.; COUTTS, A.G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 66, p. 161-167, 2000.
- KELLY, D. Regulation of gut function and immunity. In: TUCKER, L.A.; TAYLOR-PICKARD, J.A. (ed.) *Interfacing immunity, gut health and performance*. Nottingham: University Press, 2004. cap. 5, p. 61-76.
- KLEINVELD, H.A.; SWAAK, A.J.G.; HACK, C.E.; KOSTER, J.F.; Interactions between oxygen free radicals and proteins. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, Stockholm, v. 18, p. 341-352, 1989.
- KNARREBORG, A.; LAURIDSEN, C.; ENGBERG, R.M.; JENSEN, S.K. Dietary Antibiotic Growth Promoters Enhance the Bioavailability of α -tocopheryl Acetate in Broilers by Altering Lipid Absorption. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p. 1487-1492, 2004.
- KONSTANTINOV, A.A.; PESKIN, A.V.; POPOVA, E.Y.; KHOMUTOV, G.B.; RUUGE, E.K.; Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 894, p. 1-10, 1987.
- KUTZLER, L.W.; PETERSON, C.M.; ELLIS, M.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; ARMSTRONG, T.A.; McKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Ractopamine (Paylean) response in heavy-weight finishing pigs. **Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 26 p. 243-249, 2010.

KUTZLER, L.W.; HOLMER, S.F.; BOLER, D.D.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; PARKS, C.W.; MCKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Comparison of varying doses and durations of ractopamine hydrochloride on late-finishing pig carcass characteristics and meat quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 2176-2188, 2011.

LAHUCKY, R.; NUERNBERG, K.; KOVAC, L.; BUCKO, O.; NUERNBERG, G. Assessment of the antioxidant potential of selected plant extracts - in vitro and in vivo experiments on pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 85, p. 779-784, 2010.

LALLÈS, J.; BOSI, P.; SMIDT, H.; STOKES, C.R. Weaning - a challenge to gut physiologists. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 108, p. 82-93, 2007.

LALLÈS, J-P.; BOUDRY, G.; FAVIER, C.; FLOC'H, N.; LURON, I.; MONTAGNE, L.; OSWALD, I.; PIÉ, S.; PIEL, C.; SÈVE, B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, Paris, v. 53, p. 301-316, 2004.

LAMY, V.; ROUSSI, S.; CHAABI, M.; GOSSÉ, F.; SCHALL, N.; LOBSTEIN, A.; RAUL, F. Chemopreventive effects of lupulone, a hop b-acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, p. 1575-1581, 2007.

LAURIDSEN, C. Bioavailability of natural and synthetic vitamin E in sows and their progeny. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 383, 2008.

LAURIDSEN, C. Evaluation of the effect of increasing dietary vitamin E in combination with different fat sources on performance, humoral immune responses and antioxidant status of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 85-94, 2010.

LEE, C.H.; HAN, Y.K.; LEE, K.U.; KIM J.D.; CHO W.T.; KO T.G.; HAN IN.K. Study on the nutritive value of dextrin as a carbohydrate source for pigs weaned at 21 days of age. **Journal of Animal and Feed Science**, Jablonna, v. 9, p. 647-663, 2000.

LI, D.F.; NELSEN, J.L.; REDDY, P.G.; BLECHA, F.; KLEMM, R.D.; GIESTING, D.W.; HANCOCK, J.D.; ALLEE, G.L.; GOODBAND, R.D. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 3299-3307, 1991.

LIU, C.Y.; GRANT, A.L.; KIM, K.H.; JI, S.Q.; HANCOCK, D.L.; ANDERSON, D.B. MILLS, S.E. Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 62-67, 1994.

MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, Washington, v. 307, p. 1920-1925, 2005.

MAIORKA, A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M. FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. cap. 8, p. 113-123.

MARION, J.; BIERNAT, M.; THOMAS, F.; SAVARY, G.; BRETON, Y.L.; ZABIELSKI, R.; LE HUËROU-LURON, I.; LE DIVIDICH, J. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 42, p. 339-354, 2002.

MAVROMICHALIS, I.; HANCOCK, J.D.; HINES, R.H.; SENNE, B. W.; CAO, H. Lactose, sucrose and molasses in simple and complex diets for nursery pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 93, p. 127-135, 2001.

McBRIDE, B.W.; KELLY, J.M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 2997-3010, 1990.

McCRACKEN, B.A.; SPURLOCK, M.E.; ROOS, M.A.; ZUCKERMANN, F.A.; GASKINS, H.R. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglets small intestine. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, p. 613-619, 1999.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotic. **Pig Progress**, Doetinchem, v. 16, p. 18-21, 2000.

MERSMANN, H.J. Overview of the effects of betaadrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 160-172, 1998.

MILLER, B.G.; JAMESA, P.S.; SMITHA, M.W.; BOURNEA, F.J. Effect of weaning on the capacity of pigs intestinal villi to digest and absorb nutrients. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.107, p.579-589,1986.

MILLER, B.G.; BAILEY, M.; TELEMO, E.; STOKES, C.R.; BOURNE F. Disease interactions in pigs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 34, p. 53-55, 1988.

MILLS, S.E. Biological basis of the ractopamine response. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. E28-E32, 2002.

MOLLY, K. Formulation to solve the intestinal puzzle. **Pig Progress**, Doetinchem, v.17, p 20-22, 2001.

MORRISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.A.; GALVIN, K.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Lipid in meat and meat product. **Meat Science**, Amsterdam, v. 49, p. S73-S86, 1998.

PETERLA, T.A.; SCANES, C.G. Effect of β -adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 1024-1029, 1990.

NABUURS, M.J.A.; ZIJDERVELD, F.G. van; DE LEEUW, P.W. Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhoea in pigs at weaning. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 55, p. 70-77, 1993a.

NABUURS, M.J.A.; HOOGENDOOM, A.; MOLEN, E.J. van der; OSTA, A.L.M. van. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 55, p. 78-84, 1993b.

NABUURS, M.J.A.; HOOGENDOOM, A.; ZIJDERVELD, F.G. van. Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 56, p. 379-385, 1994.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; XU, Y.; MCALLISTER, Z.T. Effects of hops on in vitro ruminal fermentation of diets varying in forage content. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 138, p. 193-201, 2011.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; XU, Z.; ALEXANDER, T.; GARDEN, S.; MCALLISTER, T. Effects of hop varieties on ruminal fermentation and bacterial community in an artificial rumen (rusitec). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 93, p. 45-52, 2013.

NIEWOLD, T.A.; VAN ESSEN, G.J.; NABUURS, M.J.A.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; MEULEN, J. van der. A review of porcine pathophysiology: a different approach to disease. **Veterinary Quarterly**, London, v. 22, p. 209-212, 2000.

NIEWOLD, T.A. Intestinal genomics for evaluation of alternatives for AGP, current situation and perspectives. In: BARUG, D.; JONG, J. de; KIES, A.K.; VERSTEGEN, M. (Ed.) **Antimicrobial Growth Promoters: Where Do We Go from Here?**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. chap. 23, p. 361-368.

NIEWOLD, T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, Oxford, v. 86, p. 605-609, 2007.

PARRA, J.; AGUDELO, J.T.; ORTIZ, L.; RAMÍREZ, M.C.; RODRÍGUEZ, B.; LÚPEZ HERRERA, A.; Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* has detrimental effects on the intestinal morphology of weaned pigs. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 24, p. 598-608, 2011.

PEDROSO, A.A.; OETTING, L.L.; UTIYAMA, C.E.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R.; MIYADA, V.S. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1225-1233, 2005.

PLUSKE, J.R.; WILLIAMS, I.H.; AHERNE, F.X. Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cows' milk after weaning. **Animal Science**, Penicuik, v. 62, p. 145-158, 1996.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 51, p. 215-236, 1997.

QIANG, Z.; SHENTU, F.; WANG, B.; WANG, J.; CHANG, J.; SHEN, J. Residue depletion of ractopamine and Its metabolites in swine tissues, urine, and serum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 4319-4326, 2007.

REID, G.; SANDERS, M.E.; GASKINS, H.R.; GIBSON, G.R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T.R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 37, p. 105-118, 2003.

RIKARD-BELL, C.; CURTIS, M.A.; VAN BARNEVELD, R.J.; MULLAN, B.P.; EDWARDS, A.C.; GANNON, N.J.; HENMAN, D.J.; HUGHES, P.E.; DUNSHEA, F.R. Ractopamine hydrochloride improves growth performance and carcass composition in immunocastrated boars, intact boars, and gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 3536-3543, 2009.

ROSSI, R.; PASTORELLI, G.; CANNATA, S.; TAVANIELLO, S.; MAIORANO, G.; CORINO, C. Effect of long term dietary supplementation with plant extract on carcass characteristics meat quality and oxidative stability in pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 95, p. 542-548, 2013.

ROTHKOTTER, H.J.; KIRCHHOFF, T. PABST, R. Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. **Gut**, London, v. 35, p. 1582-1589, 1994.

ROTHKOTTER, H.J.; ULBRICH, H.; PABST, R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cells subsets in conventional and *germ-free* pigs. **Pediatric Research**, Philadelphia, v. 29, p. 237-242, 1991.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, p. 105-124, 2003.

SCHAFFNER, T, MUELLER, J.; HESS, M.W.; COTTIER, H.; SORDAT, B.; ROPKE, C. The bursa of Fabricius: A central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content. **Cellular Immunology**, New York, v. 13, p. 304-312, 1974.

SCHINCKEL, A.P.; RICHERT, B.T.; HERR, C.T.; Variation in the response of multiple genetic populations of pigs to ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. E85-E89, 2002.

SCHINCKEL, A.P.; LI, N.; RICHERT, B.T.; PRECKEL, P.V.; EINSTEIN, M.E. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 1106-1119, 2003.

SHAHIDI, F.; PEGG, R.B. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. **Journal of Food Lipids**, Hoboken, v. 1, p. 177-186, 1994.

SHIMURA, M.; HASUMI, A.; MINATO, T.; HOSONO, M.; MIURA, Y.; MIZUTANI, S.; KONDO, K.; OIKAWA, S.; YOSHIDA, A. Isohumulones modulate blood lipid status through the activation of PPAR α . **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1736, p. 51-60, 2005.

SIRAGUSA, G.R.; HAAS, G.J.; MATHEWS, D.D.; SMITH, R.J.; BUHR, R.J.; DALE, N.M.; WISE, M.G. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract, jejunum and caecum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 61, p. 853-858, 2008.

SMIRNOV, A.; PEREZ, R.; AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine Are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth Promoter Supplementation. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 135, p. 187-192, 2005.

SMITH, D.J.; SHELVER, W.L. Tissue residues of ractopamine and urinary excretion of ractopamine and metabolites in animals treated for 7 days with dietary ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. 1240-1249, 2002.

SNEL, J.; HARMSSEN, H.J.M.; VAN DER WIELEN, P.W.J.J.; WILLIAMS, B.A. Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals and its potential to improve intestinal health. In: BLOCK, M.C.; VAHL, H.A.; LANGE, L.; VAN DE BRAAK, A.E.; HEMKE, G.; HESSING, M. (Ed.). **Nutrition and health of the gastrointestinal tract**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2002. chap. 2, p. 37-69.

SPURLOCK, M.E.; CUSUMANO, J.C.; JI, S.Q.; ANDERSON, D.B.; SMITH, C.K.; HANCOCK, D.L.; MILLS, S.E. The effect of ractopamine on β -adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 75-80, 1994.

SRINIVASAN, V.; GOLDBERG, D.; HAAS, G.J. Contributions to the antimicrobial spectrum of hop constituents. **Economic Botany**, New York, v. 58, p. 230-238, 2004.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Hop (*Humulus lupulus* L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 109, p. 162-172, 2013.

TAGASHIRA, M.; WATANABE, M.; UEMITSU, N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, New York, v. 59, p. 740-742, 1995.

TANG, W.; CHEN, L.H.; DAUN, H.; HO, C.T.; PAN, M.H. Inhibitory effects of hexahydro-b-acids in LPS-stimulated murine macrophage. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 3, p. 215-222, 2011.

TILLMAN, G.E.; HAAS, G.J.; WISE, M.G.; OAKLEY, B.; SMITH, M.A.; SIRAGUSA, G.R. Chicken intestine microbiota following administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 77, p. 395-403, 2011.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; MANDEL, L.; TREBICHAUSKY, I.; KOVÀOU, R.B.; STERZL, J. Development of immune responses in early pig ontogeny. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 43, p. 135-142, 1994.

TURRENS, J.F.; FREEMAN, B.A.; LEVITT, J.G.; CRAPO, J.D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 217, p. 401-410, 1982.

TZIPORI, S.; CHANDLER, D.; MAKIN, T.; SMITH, M. *Escherichia coli* and rotavirus infections in four-week-old gnotobiotic piglets fed milk or dry food. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 56, p. 279-284, 1980.

UMESAKI, Y.; SETOYAMA, H.; MATSUMOTO, S.; IMAOKA, A.; ITOH, K. Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, p. 3504-3511, 1999.

VAN HOYWEGHEN, L.; BIENDL, M.; HEYERICK, A. Radical scavenging capacity of hop-derived products. **Brewing Science**, v. 63, p. 1-5, 2010.

VERBEKE, W.; VAN OECKEL, M.J.; WARNANTS, N.; VIAENE, J.; BOUCQUÉ, C.V. Consumer perceptions, facts and possibilities to improve acceptability of health and sensory characteristics of pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 53, p. 77-99, 1999.

WANG, Y.; CHAVES, A.V.; RIGBY, F.L.; HE, M.L.; MCALLISTER, T.A. Effects of hops on ruminal fermentation, growth, carcass traits and shedding of *Escherichia coli* of feedlot cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, p. 135-140, 2010.

WESTRÖM, B.R. The young pig as a model for intestinal absorption of macromolecules. In.: LAPLACE, J.P.; FÉVRIER, C.; BARBEAU, A. (Ed.). **Digestive physiology in pig**. Cambridge: EAAP Publication, v. 88, 1997. p. 37-40.

WEISS, W.P.; MAHAN, D.C. Oxidative stress during the lifecycle of animals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 383, 2008.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN M.E.; AUST, S.D. Deleterious ironmediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 32, p. 577-583, 2002.

WILLIAMS, N.H.; CLINE, T.R.; SCHINCKEL, A.P.; JONES, D.J. The impact of ractopamine, energy intake, and dietary fat on finisher pig growth performance and carcass merit. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 3152-3162, 1994.

WU, G.; KNABE, D.A.; KIM, S.W. Arginine nutrition in neonatal pigs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 2783-2790, 2004.

YAJIMA, H.; IKESHIMA, E.; SHIRAKI, M.; KANAYA, T.; FUJIWARA, D.; ODAI, H.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; OIKAWA, S.; KONDO, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor {alpha} and {gamma} and reduce insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, p. 33456-33462, 2004.

YAMAGUCHI, N.; SATOH-YAMAGUCHI, K.; ONO, M. *In Vitro* Evaluation of Antibacterial, Anticollagenase, and Antioxidant Activities of Hop Components (*Humulus lupulus*) Addressing Acne vulgaris. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 369-376, 2009.

YI, G.; HAUG, A.; NYQUIST, N.F.; EGELANDSDAL, B. Hydroperoxide formation in different lean meats. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 141, p. 2656-2665, 2013.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 74, p. 139-161, 1994.

ZANOLI, P.; RIVASI, M.; ZAVATTI, M.; BRUSIANI, F.; BARALDI, M. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 102, p. 102-106, 2005.

ZAREIE, M.; JOHNSON-HENRY, K.; JURY, J.; YANG, P.; NGAN, B.; MCKAY, D.; SODERHOLM, J.; PERDUE, M.; SHERMAN, P. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. **Gut**, London, v. 55, p. 1556-1560, 2006.

ZUURBIER, K.W.M.; FUNG, S.Y.; SCHEFFER, J.J.C.; VERPOORTE, R. Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 77-82, 1995.

2 EFEITOS DE β -ÁCIDOS DO LÚPULO (*Humulus lupulus*) NA DIETA SOBRE O DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS¹

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) ou de um antimicrobiano melhorador do desempenho (colistina) na dieta sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e energia da dieta, ocorrência de diarreia, refugagem de leitões, explosão respiratória, peso de órgãos, histologia do intestino delgado e diversidade da microbiota intestinal de leitões recém-desmamados, assim como testar *in vitro* a sensibilidade de bactérias aos β -ácidos do lúpulo. Foram utilizados 200 leitões desmamados aos 21 dias de idade ($6,23 \pm 0,32$ kg), machos castrados e fêmeas, em um experimento em blocos completos casualizados com 5 tratamentos, 8 repetições por tratamento e 5 leitões por unidade experimental (baia). Os leitões foram alimentados com dietas suplementadas com 0 (controle negativo), 120, 240 ou 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo ou com 40 mg/kg de colistina (tratamento antimicrobiano) durante 35 dias de período experimental. No 7º e 35º dias do experimento, um macho castrado por baia foi sacrificado para avaliação do peso de órgãos (estômago, pâncreas, fígado, intestino delgado e baço), histologia do intestino delgado (altura de vilosidade e profundidade de cripta) e diversidade da microbiota intestinal (PCR-DGGE). ANOVA e contrastes ortogonais foram utilizados para determinar o efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta (0, 120, 240, 360 mg/kg) sobre as variáveis, assim como para comparar o tratamento antimicrobiano com cada um dos outros tratamentos. O aumento dos níveis de β -ácidos na dieta melhorou linearmente ($P < 0,05$) o peso vivo, o ganho de peso, a eficiência alimentar e a digestibilidade aparente do extrato etéreo da dieta. O tratamento antimicrobiano melhorou ($P < 0,03$) o peso vivo, o ganho de peso e a eficiência alimentar comparado ao controle negativo, porém não afetou ($P > 0,05$) a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o consumo de ração. De maneira geral, a ocorrência de diarreia foi menor ($P < 0,01$) nos tratamentos antimicrobiano, controle negativo e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo do que nos tratamentos 120 e 240 mg/kg de β -ácidos do lúpulo, enquanto não foram identificados leitões refugos durante todo o período experimental. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre a explosão respiratória no sangue, peso relativo dos órgãos, histologia do intestino delgado e diversidade da microbiota intestinal. Apenas *Staphylococcus aureus* foi sensível aos β -ácidos do lúpulo, enquanto *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim* e *Enterococcus faecalis* foram resistentes. Portanto, a inclusão de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) até 360 mg/kg na dieta demonstrou ser eficiente como alternativa aos antimicrobianos melhoradores do desempenho para leitões recém-desmamados.

Palavras-chave: Aditivo; Diversidade microbiana intestinal; Explosão respiratória; Histologia do intestino delgado; Peso dos órgãos; Ocorrência de diarreia

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of dietary graded levels of hop (*Humulus lupulus*) β -acids or antimicrobial growth promoter (colistin) on growth performance, nutrients and energy digestibility, diarrhea occurrence, unthrifty pigs, blood

¹ Versão em português do artigo submetido para o periódico "Journal of Animal Science" em 23/11/2014.

respiratory burst, organ weights, small intestine histology, and intestine microbial diversity of weanling pigs, as well as *in vitro* bacteria sensitivity to hop β -acids. Two hundred 21-d weaned castrated male and female pigs (6.23 ± 0.32 kg BW) were used in a randomized complete block design experiment with 5 treatments, 8 replications, and 5 pigs per experimental unit (pen). Pigs were fed corn-soybean meal basal diets supplemented with 0 (negative control), 120, 240, or 360 mg/kg hop β -acids, or with 40 mg/kg colistin (antimicrobial treatment) during a 35-d nursery feeding experiment. On d 7 and 35 of experiment, one castrated male from each pen was slaughtered to evaluate organ weights (stomach, pancreas, liver, small intestine, spleen), small intestine histology (villus height and crypt depth), and intestine microbial diversity (PCR-DGGE). ANOVA and orthogonal contrasts were performed to determine dose-response of each variable to dietary hop β -acids levels (0, 120, 240, and 360 mg/kg), as well as to compare means of antimicrobial treatment to each other treatments. Increasing dietary levels of hop β -acids linearly improved ($P < 0.05$) BW, ADG, G:F, and apparent digestibility of ether extract of feed of weanling pigs. The antimicrobial treatment improved ($P < 0.03$) BW, ADG, and G:F compared to negative control, but did not affect ($P > 0.05$) nutrients and energy digestibility. No effects ($P > 0.05$) of treatments were observed on ADFI. Overall, the diarrhea occurrence was lower ($P < 0.01$) for antimicrobial treatment, negative control, and 360 mg/kg hop β -acids than for 120 and 240 mg/kg hop β -acids, while no unthrifty pigs were identified throughout all experimental period. No effects ($P > 0.05$) of dietary treatments were observed on blood respiratory burst, organ weights, small intestine histology, and intestine microbial diversity. *Staphylococcus aureus* was sensitive to hop β -acids, while *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim*, and *Enterococcus faecalis* were resistant. Therefore, dietary hop (*Humulus lupulus*) β -acids up to 360 mg/kg showed to be efficient as an alternative to antimicrobial growth promoters for weanling pigs.

Keywords: Diarrhea occurrence; Feed additive; Intestine microbial diversity; Organ weights; Respiratory burst; Small intestine histology

2.1 Introdução

O período após o desmame de leitões tem sido marcado por limitada capacidade de digestão de alimentos e absorção de nutrientes, anorexia, diarreia e reduzida taxa de crescimento (BIAGI et al., 2007; LALLÈS et al., 2007; MARION et al., 2002). Nutricionalmente, a substituição do leite da porca por dietas secas à base de ingredientes vegetais e o reduzido consumo de ração têm induzido uma resposta adaptativa do trato gastrointestinal, que inclui mudanças no peso dos órgãos e na mucosa e microbiota intestinal (MARION et al., 2002; PLUSKE et al., 1997). Portanto, doses não terapêuticas de antimicrobianos têm sido utilizadas nas dietas com o propósito de melhorar o estado de saúde e o desempenho de leitões recém-desmamados. Entretanto, devido ao aumento das restrições ao uso de antimicrobianos como melhoradores do desempenho, existe grande necessidade de desenvolvimento de estudos com aditivos alternativos.

Os β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*, Cannabaceae) têm sido reportados como melhoradores do desempenho de frangos de corte (BOZKURT et al., 2009; CORNELISON et

al., 2006), demonstrando atividade antimicrobiana contra *Clostridium perfringens* no intestino de frangos (SIRAGUSA et al., 2008; TILLMAN et al., 2011). *In vitro*, mudanças na população microbiana do rúmen também têm sido induzidas pelos β -ácidos do lúpulo (NARVAEZ et al., 2011, 2013; WANG et al., 2010). As propriedades atribuídas aos β -ácidos do lúpulo incluem, também, atividades antiviral (BUCKWOLD et al., 2004), anti-inflamatória (CLEEMPUT et al., 2009; TANG et al., 2011), antioxidante (TAGASHIRA et al., 1995), antidepressiva (ZANOLI et al., 2005), anticâncer (LAMY et al., 2007) e lipolítica (SHIMURA et al., 2005; SUMIYOSHI; KIMURA, 2013; YAJIMA et al., 2004). Entretanto, não há informação científica disponível sobre os efeitos dos β -ácidos do lúpulo em suínos.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo ou de um antimicrobiano melhorador do desempenho (colistina) na dieta sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e energia, ocorrência de diarreia, refugagem de leitões, explosão respiratória, peso relativo dos órgãos, histologia do intestino delgado e diversidade da microbiota intestinal de leitões recém-desmamados, assim como testar *in vitro* a sensibilidade bacteriana aos β -ácidos do lúpulo.

2.2 Material e Métodos

O estudo foi realizado na Unidade de Pesquisa em Suínos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP, Brasil). Todos os procedimentos usando animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA / ESALQ / USP (Protocolo 2012-10).

Delineamento experimental, animais e tratamentos

Foram utilizados 200 leitões desmamados aos 21 dias de idade ($6,23 \pm 0,32$ kg de peso vivo), machos castrados e fêmeas, em um experimento em blocos completos casualizados, baseados no peso vivo e sexo, com 5 tratamentos, 8 repetições por tratamento e 5 animais por unidade experimental (baia). Os leitões foram alojados em baias de 1,20x1,50m com piso parcialmente ripado, equipadas com um comedor semiautomático, um bebedor tipo chupeta e uma fonte de calor suplementar, em uma sala de creche com ventilação natural. Antes do alojamento dos animais, a sala de creche foi apenas lavada com água, não sendo utilizados desinfetantes químicos com o propósito de fornecer uma condição de maior desafio sanitário aos leitões. Ração e água foram fornecidas à vontade aos leitões durante os 35 dias do período experimental.

As dietas basais (Tabela 2.1) foram formuladas de acordo as exigências nutricionais dos suínos (ROSTAGNO et al., 2011), sendo adotado um programa de alimentação de três fases: pré-inicial 1 (1 a 7 dias de experimento); pré-inicial 2 (7 a 21 dias de experimento); e inicial (21 a 35 dias de experimento).

Tabela 2.1 - Composição das dietas basais (matéria natural)

Item	Pré-inicial 1	Pré-inicial 2	Inicial
Ingredientes, %:			
Milho	47,90	56,10	67,09
Farelo de soja, 46%	20,00	22,00	25,00
Concentrado proteico de soja	4,99	3,75	-
Soro de leite desidratado	11,90	5,27	-
Leite integral desidratado	3,00	1,50	-
Plasma sanguíneo desidratado	3,00	1,50	0,50
Açúcar	3,00	3,00	3,00
Óleo de soja	2,16	2,54	0,49
Fosfato bicálcico	1,65	1,67	1,63
Calcário	0,65	0,74	0,76
Sal	0,17	0,30	0,42
Óxido de Zinco	0,30	0,25	-
L-Lisina.HCl, 78%	0,41	0,47	0,40
DL-Metionina, 99%	0,20	0,19	0,12
L-Treonina, 98.5%	0,14	0,16	0,11
L-Triptofano, 98%	0,02	0,03	0,02
L-Valina, 96.5%	0,07	0,08	0,03
Cloreto de colina, 60%	0,04	0,04	0,03
Premix de micromineral ¹	0,20	0,20	0,20
Premix vitamínico ²	0,20	0,20	0,20
Total	100,00	100,00	100,00
Composição calculada:			
Energia metabolizável, kcal/kg	3,400	3,375	3,230
Proteína bruta, %	20,92	19,53	17,48
Cálcio, %	0,85	0,83	0,77
Fósforo disponível, %	0,50	0,45	0,40
Lactose, %	10,00	4,50	-
Lisina digestível, %	1,45	1,33	1,09
Metionina digestível, %	0,49	0,45	0,35
Treonina digestível, %	0,91	0,84	0,69
Triptofano digestível, %	0,26	0,24	0,20

¹Fornecendo por kg da dieta: Cu, 20 mg; I, 1,6 mg; Fe, 120 mg; Mn, 60 mg; Se, 460 µg; Zn, 140 mg; e Cr, 200 µg.

²Fornecendo por kg da dieta: vitamina A, 5.332 IU; vitamina D₃, 2.000 IU; vitamina E, 20 mg; vitamina K₃, 5,33 mg; biotina, 33,12 µg; colina, 240 mg; ácido fólico, 0,54 mg; niacina, 26 mg; ácido pantotênico, 14 mg; riboflavina, 3,20 mg; tiamina, 1,33 mg; piridoxina, 1,33 mg; vitamina B₁₂, 22 µg; e BHT, 4,32 mg.

Os leitões foram alimentados com dietas suplementadas com 0 (controle negativo), 120, 240 ou 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo ou com 40 mg/kg de colistina (tratamento antimicrobiano). Uma vez que os β -ácidos do lúpulo possuem acentuado sabor amargo, os níveis nas dietas foram estabelecidos com base em um ensaio de aceitação com o propósito de se obterem consumos de ração similares em todos os tratamentos. Os β -ácidos do lúpulo, que representam o coletivo do lupulone ($C_{27}H_{38}O_4$), colupulone ($C_{26}H_{37}O_4$) e adlupulone ($C_{27}H_{38}O_4$), foram microencapsulados com celulose para conter 30% de β -ácidos do lúpulo total (Hopsteiner, NY, EUA; Wallerstein, SP, Brasil) com o propósito de prevenir sua oxidação. Os β -ácidos do lúpulo são reconhecidos como GRAS (geralmente conhecidos como seguros) para uso como agente antimicrobiano em salsichas e carnes cozidas (GRN nº 63, Food and Drug Administration, EUA) e podem ser considerados seguros para humanos e animais.

Desempenho zootécnico e digestibilidade de nutrientes da dieta

Os leitões foram pesados individualmente nos dias 0, 7, 21 e 35 de experimento e o desaparecimento de ração foi mensurado por balança para calcular o ganho diário de peso (GDP), o consumo diário de ração (CDR) e a eficiência alimentar (EA) por período de alimentação (0 a 7, 7 a 21 e 21 a 35 dias de experimento) e acumulado (0 a 21 e 0 a 35 dias de experimento).

Com o propósito de estimar a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta, os leitões foram alimentados com dietas contendo 500 mg/kg de óxido crômico (marcador de indigestibilidade) durante as fases pré-inicial 2 e inicial. Após o período de 7 dias de adaptação (fluxo do marcador), as fezes foram coletadas duas vezes ao dia diretamente do reto dos leitões (pelo menos 2 animais por balança por coleta) durante o período de 5 dias e armazenadas a -20°C . Amostras das dietas e das fezes homogeneizadas por balança foram analisadas usando procedimentos padrão (AOAC, 2005). A digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral, proteína bruta, extrato etéreo, extrativo não nitrogenado e energia bruta da dieta foram calculados conforme proposto por Matterson et al. (1965).

Ocorrência de diarreia, refugagem de leitões e explosão respiratória

A ocorrência de diarreia foi calculada como a proporção de dias em que os animais apresentaram sinais clínicos de diarreia (fezes líquidas), através do monitoramento da presença ou ausência de diarreia em cada animal duas vezes por dia. A frequência de

refugagem de leitões foi determinada pela observação diária de sinais de anorexia (exposição das vértebras).

Para a determinação da explosão respiratória, foram coletadas amostras de 4 mL de sangue via punção da veia cava anterior de um macho castrado por baia nos dias 4, 8, 16 e 32 de experimento, com o propósito de verificar a curva de ativação dos fagócitos durante a fase de creche. A produção de espécies reativas de oxigênio pelos fagócitos no sangue (*burst* respiratório) foi mensurada conforme descrito por Anderson e Siwicki (1995): foi adicionado sangue heparinizado (0,1 mL) dentro de um tubo de ensaio, misturado com corante (0,1 mL) 0,2% de nitroazul de tetrazólio (NBT) (Sigma, MO, EUA) e incubado por 30 min. à temperatura ambiente. Em seguida, uma amostra (0,05 mL) da suspensão de células sanguíneas com NBT foi adicionada a 1,0 mL de solução de N,N-dimetilformamida e centrifugado por 5 min à 3.000 x g; para finalizar, o sobrenadante foi colocando em uma cubeta de vidro e mensurada a absorbância a 540 nm usando um espectrofotômetro.

Peso dos órgãos, histologia do intestino delgado e diversidade da microbiota intestinal

No 7º ($8,03 \pm 0,32$ kg de peso vivo) e 35º ($20,61 \pm 0,90$ kg de peso vivo) dias do experimento, um macho castrado com peso corporal mais próximo da média de peso corporal dos animais de cada baia (totalizando 8 animais por tratamento) foi abatido seguindo métodos de abate humanitário (insensibilização por corrente elétrica seguida de exsanguinação) para a coleta de órgãos, tecido intestinal e conteúdo luminal.

O peso relativo do estômago vazio, pâncreas, fígado, intestino delgado vazio e baço foram calculados como a proporção de cada órgão em relação ao peso corporal dos animais abatidos, enquanto a densidade do intestino delgado foi determinada pela relação peso:comprimento do intestino delgado.

Para a avaliação da histologia do epitélio intestinal, amostras de 3 cm do duodeno (retiradas a 15 cm da válvula pilórica), jejuno (retiradas a 150 cm da junção ileocecal) e íleo (retiradas a 15 cm da junção ileocecal) foram coletadas e fixadas em formalina. Após isso, cada amostra foi preparada em parafina e quatro secções do tecido de 6 µm foram cortadas e coradas com hematoxilina-eosina. A altura de vilosidade e a profundidade de cripta foram medidas em vinte vilosidades por amostra usando um microscópio óptico (AFIP, 1994).

A diversidade da microbiota do conteúdo luminal do íleo e do ceco dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano e 360 mg/kg de β-ácidos do lúpulo foi determinada usando PCR-DGGE (reação em cadeia de polimerase – eletrofose em gel de gradiente desnaturante). O DNA bacteriano total foi extraído das amostras usando o kit Power Soil® DNA Isolation

(MOBIO) seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante, exceto que 0,25g de conteúdo luminal do intestino foram utilizados ao invés de solo. O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel 1% (w/v) de agarose, corado com Sybr Gold e visualizado com luz UV. A região V3 do gene bacteriano 16S foi amplificada usando como *primer forward* o F356 (5'-GC-CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGTACGGGAGGCAGCAG-3') e como *primer reverse* o R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Para acessar as bactérias ácido-láticas, duas reações de amplificação foram realizadas utilizando como *primers forward* o Lac1 (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3') e o Lac3 (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCGG-3'), e como *primer reverse* o Lac2 (5'-GCCGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCCGGGGGCACCGGGGGATTTCACCGCTACAGCTACACATG-3'). Todas as reações de PCR utilizaram uma mistura contendo 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão 1x TAE, 200µM de deoxiribonucleotídeos, 1.500 µM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, e 2µL de DNA, além de água milli-Q estéril para completar o volume final de 25µL. As amplificações foram realizadas usando um termociclador automático (Mastercycler personal, Eppendorf), seguindo os seguintes programas: para a região V3 do gene bacteriano 16S, desnaturação inicial a 95°C por 5 min. seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min., anelamento a 60°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min., sendo a etapa de extensão final a 72°C por 10 min.; e para o gene das bactérias ácido-láticas, desnaturação inicial a 94°C por 2 min. seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 60°C por 2 min. e extensão a 72°C por 1 min., sendo a etapa de extensão final a 72°C por 30 min. O rDNA parcialmente amplificado de cada grupo bacteriano foi separado em gel de DGGE com 8% (w/v) poliacrilamida (37,5:1 acrilamida:bis acrilamida) utilizando um gradiente de desnaturação entre 20–60% (100% desnaturante continha 7 M ureia e 40% [vol/vol] de formamida deionizada). A corrida dos géis de DGGE foi realizada em tampão 0,5× TAE (20 mM tris, pH 7,4, 10 mM de acetato de sódio, 0,5 mM de EDTA dissódico) a 200V por 4h a 60°C. Foram adicionados 4 padrões em todos os géis para facilitar a comparação entre géis. Após a eletroforese, os géis foram corados com prata de acordo ao protocolo: incubação em solução fixadora (10% de etanol+0,5% de ácido acético) por 10 min.; incubação em solução de nitrato de prata (0,2% de nitrato de prata dissolvido na solução fixadora) por 10 min.; três lavagens em água duplamente destilada (ddH₂O) por 3 min.; e incubação em solução para a revelação (15% NaOH+0,05% formaldeído) por 3-5 min. seguido pela adição de 7,5 g/L de carbonato de sódio por 10-15 min.. Então, os géis foram scaneados e as bandas visualizadas. Cada banda

foi considerada uma unidade taxonômica operacional (OTU). O perfil do DGGE foi analisado através da matriz de presença ou ausência de bandas para calcular os valores de similaridade entre as amostras através da Análise de Componente Principal (ACP), do dendograma UPGMA usando o coeficiente de similaridade de Jaccard (PAST 3.0 software; Hammer et al., 2001) e do diagrama de Venn. Para identificar as principais bactérias amplificadas pelos *primers* Lac1 e Lac3, as bandas presentes na maioria das amostras foram re-amplificadas com *primers* sem grampo GC, purificadas usando um kit comercial (PCR cleaner, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, sequenciadas (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), e as sequências foram comparada com as sequências do NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando a ferramenta BLASTN.

Sensibilidade bacteriana in vitro aos β -ácidos do lúpulo

A atividade antimicrobiana dos β -ácidos do lúpulo contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* foi determinada pela mensuração do diâmetro da zona de inibição usando o método padrão de disco difusão (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2013). Todas as culturas bacterianas foram submetidas a discos contendo 4,5, 9,0, 18,0, 27,0, 36,0 e 45,0% de β -ácidos do lúpulo em triplicata. Foi realizada incubação a 37°C por 24 horas e, após, foi medida a zona de inibição que circundava os discos.

Delineamento experimental e análise estatística

Os dados foram analisados como um experimento em blocos completos casualizados usando a baía como a unidade experimental e o procedimento MIXED do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). O modelo matemático incluiu o efeito fixo dos tratamentos e o efeito aleatório dos blocos, conforme segue: $Y(ij) = \mu + t(i) + b(j) + \varepsilon(ij)$, onde $Y(ij)$ é a variável resposta dependente; μ é a média geral; $t(i)$ é o efeito fixo dos tratamentos ($i=1, \dots, 5$); $b(j)$ é o efeito aleatório dos blocos ($j=1, \dots, 8$); e $\varepsilon(ij)$ é o erro experimental. Para os dados de digestibilidade dos nutrientes e da energia, peso relativo dos órgãos, explosão respiratória, histologia do epitélio intestinal e diversidade da microbiota intestinal, o fator medida repetida no tempo foi adicionado ao modelo matemático como efeito aleatório. Todos os dados foram testados para normalidade do resíduo, linearidade, homogeneidade de variância e *outliers*. A análise da ocorrência de diarreia considerou a distribuição de Poisson dos dados usando o procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

ANOVA e LSMEANS são apresentados nas tabelas. Valores de probabilidade $\leq 0,05$ foram considerados significativos. Contrastes linear e quadrático foram realizados para determinar os efeitos dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta (0, 120, 240 e 360 mg/kg) sobre as variáveis. Contrastes ortogonais foram usados para comparar as médias do tratamento antimicrobiano com o controle negativo e com cada um dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta.

2.3 Resultados

Desempenho zootécnico e digestibilidade de nutrientes

Conforme apresentado na Tabela 2.2, o aumento dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta aumentou linearmente ($P < 0,05$) o peso vivo, o ganho de peso e a eficiência alimentar dos leitões recém-desmamados. O tratamento antimicrobiano aumentou ($P < 0,03$) o peso vivo, o ganho de peso e a eficiência alimentar comparado ao controle negativo, porém não se diferenciou ($P > 0,05$) de nenhum dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o consumo de ração.

O aumento dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta aumentou linearmente ($P < 0,05$) a digestibilidade aparente do extrato etéreo da dieta, porém não foram observados efeitos ($P > 0,05$) sobre a digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral, proteína bruta, energia bruta e extrativo não nitrogenado da dieta (Tabela 2.3). O tratamento antimicrobiano não afetou ($P > 0,05$) a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta. Independentemente dos tratamentos, a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta foram maiores ($P < 0,05$) na dieta inicial que na dieta pré-inicial 2, exceto para o extrato etéreo. Em contraste, a digestibilidade do extrato etéreo foi menor ($P < 0,05$) na dieta inicial que na pré-inicial 2, possivelmente devido ao baixo conteúdo de gordura na dieta inicial.

Ocorrência de diarreia, refugagem de leitões e explosão respiratória

Foi observado efeito quadrático ($P < 0,01$) dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre a ocorrência de diarreia (Tabela 2.3). Os níveis 120 e 240 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta apresentaram a maior ocorrência de diarreia, enquanto o tratamento antimicrobiano, controle negativo e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo apresentaram a menor ocorrência de diarreia. Depois de 14 dias após o desmame, não foram observados sinais clínicos de diarreia (fezes líquidas). Não foi identificado ocorrência de refugagem de leitões durante todo o período experimental (frequência zero).

Não houve efeitos ($P>0,05$) dos tratamentos na explosão respiratória no sangue (Tabela 2.4). Entretanto, independentemente dos tratamentos, a explosão respiratória aumentou do dia 4 para o dia 8 pós-desmame e depois reduziu nos dias 16 e 32 ($P<0,001$), demonstrando um aumento da ativação imune imediatamente após o desmame seguido por uma redução na fase tardia da creche.

Tabela 2.2 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta sobre o desempenho zootécnico de leitões recém-desmamados¹

Item	Tratamentos						EPM	P=
	Antimicrobiano (colistina)	Níveis de β-ácidos na dieta, mg/kg						
		0	120	240	360			
Peso vivo, kg								
dia 0	6,23	6,22	6,23	6,23	6,23	0,33	..	
dia 7 ²	8,32	7,87 [†]	8,28	8,23	8,53	0,40	0,018	
dia 21 ²	14,54	13,80	14,46	14,43	15,11	0,66	0,058	
dia 35 ²	20,94	19,61 [†]	20,51	20,79	21,46	0,92	0,043	
Ganho de peso, kg/dia								
1 a 7 dias ²	281	222 [†]	275	267	307	22	0,010	
1 a 21 dias ²	385	352	383	381	412	19	0,045	
1 a 35 dias ²	425	387 [†]	414	421	441	19	0,045	
7 a 21 dias	438	426	434	444	464	20	0,383	
21 a 35 dias	492	446 [†]	466	489	489	27	0,231	
Consumo de ração, kg/dia								
1 a 7 dias	355	331	360	345	395	19	0,099	
1 a 21 dias	577	543	574	565	600	25	0,256	
1 a 35 dias	693	663	683	689	703	28	0,550	
7 a 21 dias	697	657	690	684	711	31	0,466	
21 a 35 dias	885	862	865	894	872	39	0,868	
Eficiência alimentar								
1 a 7 dias ²	0,77	0,66 [‡]	0,76	0,77	0,77	0,03	0,012	
1 a 21 dias	0,67	0,65	0,67	0,67	0,69	0,01	0,122	
1 a 35 dias ²	0,61	0,58 [‡]	0,61	0,61	0,63	0,01	0,004	
7 a 21 dias	0,63	0,65	0,63	0,65	0,66	0,01	0,362	
21 a 35 dias ²	0,56	0,52 [‡]	0,54	0,54	0,56	0,01	0,049	
Ocorrência de diarreia, %								
1 a 7 dias ³	4,10	3,47	7,88 [‡]	6,30 [‡]	4,10	0,75	<0,001	
1 a 21 dias ³	1,51	1,72	3,77 [‡]	2,91 [‡]	1,51	0,36	<0,001	
7 a 21 dias	0,22	1,12 [‡]	2,01 [‡]	1,56 [‡]	0,00	0,25	<0,001	

¹Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento e 5 leitões por baia. EPM=erro padrão da média.

²Efeito linear ($P<0,001$) dos níveis de β -ácidos na dieta sobre o peso corporal, o ganho de peso e a eficiência alimentar.

³Efeito quadrático ($P<0,001$) dos níveis de β -ácidos na dieta sobre a ocorrência de diarreia.

[†]Diferente do tratamento antimicrobiano (colistina) pelo teste de contraste ortogonal ($P<0,05$).

[‡]Diferente do tratamento antimicrobiano (colistina) pelo teste de contraste ortogonal ($P<0,01$).

Nota: Sinal convencional utilizado:

.. Não se aplica dado numérico.

Tabela 2.3 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e da fase de alimentação (pré-inicial 2 ou inicial) sobre a digestibilidade dos nutrientes e da energia da dieta de leitões recém-desmamados¹

Item	Fase	Tratamentos						EPM	Valor de P do modelo		
		Antimicrobiano (colistina)	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				Média		Nível	Fase	Nível*Fase
Matéria seca, %	Pré-inicial 2	76,54	77,39	77,45	78,65	78,76	77,76	0,51	0,478	<0,001	0,363
	Inicial	80,87	80,72	80,12	80,03	81,05	80,56				
	Média	78,70	79,05	78,79	79,34	79,91	79,16				
Matéria orgânica, %	Pré-inicial 2	78,87	79,54	79,84	80,95	81,08	80,06	0,71	0,485	<0,001	0,308
	Inicial	82,79	82,51	82,07	81,84	82,92	82,42				
	Média	80,83	81,03	80,96	81,39	82,00	81,24				
Matéria mineral, %	Pré-inicial 2	41,69	43,95	40,17	42,11	42,07	42,00	1,46	0,286	<0,001	0,995
	Inicial	48,36	50,48	47,84	49,39	49,42	49,10				
	Média	45,03	47,21	44,00	45,75	45,74	45,55				
Proteína bruta, %	Pré-inicial 2	67,16	68,10	67,76	69,87	70,34	68,64	0,98	0,471	0,048	0,322
	Inicial	72,23	69,49	69,87	68,77	71,76	70,43				
	Média	69,70	68,80	68,81	69,32	71,05	69,54				
Extrato etéreo, % ²	Pré-inicial 2 ²	62,11	57,25	60,67	64,34	65,48	61,97	1,98	0,021	<0,001	0,893
	Inicial ²	45,54	44,35	43,22	51,14	51,98	47,24				
	Média ²	53,82	50,80	51,94	57,74	58,73	54,61				
Energia bruta, %	Pré-inicial 2	75,10	74,98	74,90	76,56	76,87	75,68	0,58	0,339	<0,001	0,574
	Inicial	79,25	79,02	78,12	78,22	79,55	78,83				
	Média	77,17	77,00	76,51	77,39	78,21	77,26				
Extrato não nitrogenado, %	Pré-inicial 2	88,59	89,06	89,30	89,72	89,76	89,29	0,34	0,764	<0,001	0,643
	Inicial	90,68	90,83	90,76	90,42	90,81	90,70				
	Média	89,64	89,95	90,03	90,07	90,29	90,00				

¹Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento e 5 leitões por baía. EPM=erro padrão da média.

²Efeito linear (P<0,001) dos níveis de β -ácidos na dieta sobre a digestibilidade do extrato etéreo.

Tabela 2.4 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e tempo de coleta após o desmame sobre a explosão respiratória no sangue dos leitões recém-desmamados¹

Tratamentos										
Níveis de β -ácidos na dieta,										
mg/kg										
Valor de P do modelo										
Dia	Colistina	0	120	240	360	Média	EPM	Nível	Dia	Nível*Dia
4	0,732	0,732	0,747	0,745	0,743	0,740	0,026	0,680	<0,01	0,968
8	0,786	0,800	0,772	0,785	0,786	0,786				
16	0,705	0,728	0,724	0,721	0,702	0,716				
32	0,706	0,723	0,754	0,715	0,698	0,719				
Média	0,732	0,746	0,749	0,741	0,732	0,740				

¹Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento. EPM=erro padrão da média.

Peso dos órgãos, histologia do intestino delgado e diversidade da microbiota intestinal

Não foram observados efeitos ($P>0,05$) dos tratamentos sobre o peso relativo do estômago, pâncreas, fígado, intestino delgado e baço, assim como sobre a relação peso:comprimento do intestino delgado (Tabela 2.5). Independentemente dos tratamentos, o peso relativo do estômago e do intestino delgado diminuíram enquanto que o do pâncreas, fígado e baço, assim como a relação peso:comprimento do intestino delgado, aumentaram do dia 7 para o dia 35 de experimento ($P<0,03$).

Não houve efeito ($P>0,05$) dos tratamentos sobre a altura de vilosidades, a profundidade de criptas e a relação altura de vilosidade:profundidade de cripta do intestino delgado (Tabela 2.6). Independentemente dos tratamentos, a altura de vilosidade e profundidade de cripta aumentaram do dia 7 para o dia 35 de experimento ($P<0,001$).

Não foi observada interação ($P>0,05$) entre tratamento, dia de coleta e secção do intestino para o número de bandas (unidade taxonômica operacional) da região V3 do gene 16S e do grupo de bactérias ácido-láticas (Figura 2.1). Houve interação entre o dia de coleta (7 ou 35 dias pós-desmame) e a secção do intestino (íleo ou ceco) sobre o número de bandas (Figura 2.1). Com exceção do Lac3-Lac2 no íleo no dia 35, onde foram observadas 4 bandas exclusivamente no tratamento controle (Figura 2.3), as demais secções do intestino e dias de coleta apresentaram mais de 50% de bandas compartilhadas entre todos os tratamentos (Figuras 2.2; 2.3; 2.4).

Tabela 2.5 - Efeito dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e do tempo de coleta pós-desmame sobre o peso relativo dos órgãos de leitões recém-desmamados¹

Item	Dia	Tratamentos						EPM	Valor de P do modelo		
		Antimicrobiano (colistina)	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				Média		Nível	Dia	Nível*Dia
Estômago, %	7	0,82	0,75	0,72	0,74	0,80	0,76	0,02	0,428	<0,001	0,186
	35	0,62	0,70	0,63	0,69	0,67	0,66				
	Média	0,72	0,73	0,67	0,71	0,73	0,71				
Pâncreas, %	7	0,04	0,04	0,03	0,05	0,05	0,04	0,00	0,144	<0,001	0,657
	35	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06				
	Média	0,05	0,06	0,04	0,06	0,06	0,05				
Fígado, %	7	2,74	2,57	2,77	2,65	2,84	2,72	0,09	0,133	<0,001	0,531
	35	3,21	3,17	3,33	2,87	3,19	3,15				
	Média	2,97	2,87	3,05	2,76	3,01	2,94				
Intestino delgado (ID), %	7	5,86	5,71	6,20	6,54	6,40	6,14	0,14	0,153	<0,001	0,214
	35	5,14	5,03	4,91	5,09	5,16	5,07				
	Média	5,50	5,37	5,55	5,81	5,78	5,61				
Comprimento do ID, m	7	11,76	11,61	11,79	12,65	12,46	12,05	0,32	0,566	0,027	0,388
	35	14,75	13,91	14,07	14,33	13,72	14,16				
	Média	13,25	12,76	12,93	13,49	13,09	13,11				
Densidade do ID, g/m	7	44,54	44,07	46,64	47,16	46,09	45,70	1,58	0,262	<0,001	0,416
	35	67,48	64,70	66,16	66,17	72,82	67,47				
	Média	56,01	54,38	56,40	56,67	59,46	56,59				
Baço, %	7	0,16	0,15	0,14	0,14	0,16	0,15	0,01	0,192	<0,001	0,401
	35	0,17	0,19	0,18	0,16	0,19	0,18				
	Média	0,17	0,17	0,16	0,15	0,17	0,17				

¹Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento. EPM=erro padrão da média.

Figura 2.1 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o número de bandas da região V3 (A), Lac1-Lac2 (B) e Lac3-Lac2 (C) no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame. Não houve interação ($P>0,05$) entre tratamento, dia de coleta e secção do intestino. Houve interação ($P<0,07$) entre o dia de coleta e a secção intestinal. Não houve interação ($P>0,05$) entre outras combinações dos fatores principais.

Não foram observadas mudanças importantes nas comunidades bacterianas entre os tratamentos controle, antimicrobiano ou 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo, conforme demonstrado pela análise de componente principal (Figura 2.5) e pelo dendograma de similaridade (Figuras 2.6; 2.7; 2.8). Considerando o dia de coleta e a secção do intestino se pode observar: Lac 1 – grande diversidade no íleo e maior homogeneidade no ceco no dia 7 de coleta, enquanto alta similaridade entre íleo e ceco é observada no dia 35 de coleta (Figuras 2.5A; 2.6); Lac 3 – mudança na comunidade bacteriana devido ao dia de coleta (Figuras 2.5B; 2.7); e V3 – similaridade das comunidades bacterianas do íleo e do ceco no dia 7, enquanto claramente se observa uma distinção entre as secções do intestino no dia 35 de coleta (Figuras 2.5C; 2.8). Com relação ao sequenciamento das bandas de DGGE, o gênero *Lactobacillus* foi predominante para o *primer* Lac1-Lac2 e o gênero *Streptococcus* para o *primer* Lac3-Lac2.

Sensibilidade bacteriana in vitro aos β -ácidos do lúpulo

Entre todas as cepas bacterianas testadas, apenas o *Staphylococcus aureus* foi sensível ($33,09 \pm 2,56$ mm de diâmetro do disco) a concentrações entre 4,5 e 45,0% de β -ácidos do lúpulo. As bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim* e *Enterococcus faecalis* foram resistentes.

2.4 Discussão

A eficácia dos aditivos melhoradores do desempenho de leitões recém-desmamados foi exaustivamente documentada na literatura (BOSI et al., 2011; CROMWELL, 2002; NRC, 2012). Entretanto, esta eficácia pode divergir dependendo das condições de criação dos suínos, com respostas mais evidentes em criações comerciais do que em condições experimentais (NIEWOLD, 2007; NRC, 1998). Este fato motivou a adoção de práticas para aumentar o desafio ambiental neste experimento, como a não utilização de desinfetantes químicos na sala de creche e a alimentação dos animais com dietas apenas moderadamente complexas. De fato, estas práticas atingiram o seu propósito, uma vez que o desempenho zootécnico médio observado nos 35 dias de creche neste estudo ($6,23 \pm 0,33$ a $20,66 \pm 0,92$ kg de peso vivo) foi bastante inferior quando comparado ao desempenho zootécnico padrão [$6,17 \pm 0,71$ a $24,70 \pm 1,18$ kg de peso vivo (PERINA et al., 2014; SBARDELLA et al., 2012)] observado na Unidade de Pesquisa em Suínos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo.

Tabela 2.6 - Efeitos dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e do tempo de coleta pós-desmame sobre a histologia do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de leitões recém-desmamados¹

(continua)

Item	Dia	Tratamentos						Média	EPM	Valor de P do modelo		
		Antimicrobiano (colistina)	Níveis de β-ácidos na dieta, mg/kg				Nível			Dia	Nível*Dia	
			0	120	240	360						
Duodeno												
Altura de vilosidade, μm	7	475	484	460	454	412	457	22	0,670	0,019	0,369	
	35	495	478	494	491	496	491					
	Média	485	481	477	472	454	474					
Profundidade de cripta, μm	7	292	315	289	278	286	292	14	0,511	0,010	0,903	
	35	318	322	316	311	311	316					
	Média	305	318	303	294	299	304					
Ralação vilosidade:cripta	7	1,63	1,55	1,59	1,64	1,47	1,57	0,05	0,217	0,592	0,205	
	35	1,57	1,49	1,56	1,58	1,60	1,56					
	Média	1,60	1,52	1,57	1,61	1,53	1,57					
Jejuno												
Altura de vilosidade, μm	7	344	344	342	351	371	350	17	0,461	0,478	0,761	
	35	347	379	350	344	370	358					
	Média	345	361	346	348	371	354					
Profundidade de cripta, μm	7	183	172	179	190	203	186	9	0,205	<0,0001	0,355	
	35	235	236	228	218	241	232					
	Média	209	204	203	204	222	209					
Ralação vilosidade:cripta	7	1,89	2,00	1,94	1,87	1,83	1,90	0,07	0,431	<0,0001	0,850	
	35	1,48	1,61	1,55	1,57	1,54	1,55					
	Média	1,68	1,81	1,74	1,72	1,69	1,73					

Tabela 2.6 - Efeitos dos níveis de β -ácidos do lúpulo ou do antimicrobiano (colistina) na dieta e do tempo de coleta pós-desmame sobre a histologia do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de leitões recém-desmamados¹

(conclusão)

Item	Dia	Tratamentos						Média	EPM	Valor de P do modelo		
		Antimicrobiano (colistina)	Níveis de β-ácidos na dieta, mg/kg				Nível			Dia	Nível*Dia	
			0	120	240	360						
Íleo												
Altura de vilosidade, μm	7	328	331	353	313	354	336	14	0,541	0,053	0,238	
	35	366	349	361	354	337	353					
	Média	347	340	357	333	345	345					
Profundidade de cripta, μm	7	181	180	184	175	189	182	11	0,978	<0,0001	0,730	
	35	230	219	226	227	214	223					
	Média	205	200	205	201	202	203					
Ralação vilosidade:cripta	7	1,84	1,87	1,93	1,80	1,87	1,86	0,06	0,692	<0,0001	0,954	
	35	1,60	1,60	1,62	1,57	1,58	1,59					
	Média	1,72	1,73	1,78	1,68	1,73	1,73					

¹Os valores são LSMEANS de 8 repetições por tratamento. EPM=erro padrão da média.

Figura 2.2 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o perfil de DGGE (A) e diagrama de Venn (B) de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac1-Lac2) no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame

Figura 2.3 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o perfil de DGGE (A) e diagrama de Venn (B) de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac3-Lac2) no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame

Figura 2.4 - Efeitos dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo sobre o perfil de DGGE (A) e diagrama de Venn (B) de bactérias da região V3 do gene 16S no intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame

Figura 2.5 - Efeito dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre a análise de componente principal de bactérias amplificadas com os conjuntos de *primers* Lac1-Lac2 (A), Lac3-Lac2 (B) e região V3 do gene 16S (C) do intestino de leitões no dia 7 e 35 pós-desmame

Figura 2.6 - Dendrograma UPGMA usando o coeficiente de similaridade de Jaccard de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac1-Lac2) no intestino de leitões (dia 7 e 35 pós-desmame) alimentados com as dietas dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo

Figura 2.7 - Dendrograma UPGMA usando o coeficiente de similaridade de Jaccard de bactérias ácido-láticas (*primer* Lac3-Lac2) no intestino de leitões (dia 7 e 35 pós-desmame) alimentados com as dietas dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo

Figura 2.8 - Dendrograma UPGMA usando o coeficiente de similaridade de Jaccard de bactérias da região V3 do gene 16S no intestino de leitões (dia 7 e 35 pós-desmame) alimentados com as dietas dos tratamentos controle negativo, antimicrobiano (40 mg/kg de colistina) e 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo

Neste estudo, os β -ácidos do lúpulo aumentaram a taxa de crescimento dos leitões sem afetar o consumo de ração, indicando uma melhoria na eficiência de utilização da dieta, assim como observado previamente para frangos de corte (BOZKURT et al., 2009; CORNELISON et al., 2006). De fato, a inclusão de β -ácidos do lúpulo nas dietas dos leitões aumentou em até 15,60% a digestibilidade do extrato etéreo da dieta (Tabela 2.3), assim como modificou a composição corporal com redução de até 16% no conteúdo de gordura e aumento de até 2% no conteúdo de proteína do músculo *Longissimus* (dados não publicados). Este resultado pode indicar mudanças do metabolismo padrão, aparentemente redirecionando a energia para o crescimento de tecido muscular. Com o propósito de discutir esta hipótese, serão considerados resultados oriundos de α -, iso- α - e β -ácidos do lúpulo, uma vez que suas estruturas moleculares e produtos de oxidação são similares (CATTOOR et al., 2013). Além de uma patente publicada sobre os efeitos supressores da gordura corporal (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA, 2013a), os α - e iso- α -ácidos do lúpulo têm demonstrado experimentalmente afetar o metabolismo lipídico de camundongos através do aumento da β -oxidação de ácidos graxos no fígado (SHIMURA et al., 2005) e da redução do diâmetro dos adipócitos e do peso do tecido adiposo (SUMIYOSHI; KIMURA, 2013; YAJIMA et al., 2004). Acredita-se que esta resposta seja mediada pela atividade agonista da cadeia lateral dos α -ácidos do lúpulo sobre o receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR α) no fígado (SHIMURA et al., 2005; YAJIMA et al., 2004). Uma vez que a cadeia lateral dos β -ácidos do lúpulo é a mesma que a dos α -ácidos, é possível que os β -ácidos do lúpulo também possam ativar o PPAR α . Em contraste, uma patente publicada tem atribuído efeito supressante da absorção de gordura aos α -, iso- α - e β -ácidos do lúpulo (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA, 2013b), o que pode não ser apropriadamente atribuído para leitões recém-desmamados, uma vez que neste estudo a digestibilidade do extrato etéreo foi aumentada e, como consequência, um aumento da absorção de gordura poderia ser esperado. Além disso, efeitos sedativos dos α - e β -ácidos do lúpulo têm sido observados em ratos, com redução da atividade locomotora espontânea, aumento do tempo de sono induzido por cetamina e redução da temperatura corporal (SCHILLER et al., 2006). Uma vez que suínos possuem elevados custos energéticos para atividade (NOBLET et al., 1993), efeitos sedativos dos β -ácidos do lúpulo poderiam se somar à aparente melhoria observada na eficiência de utilização da dieta neste estudo.

Em contraste ao senso comum de que doses não terapêuticas de antimicrobianos exercem efeito melhorador do desempenho por alterar a microbiota intestinal (GASKINS et al., 2002), uma ação anti-inflamatória direta nas células intestinais e no sistema imune do

hospedeiro tem sido proposta (COSTA et al., 2011; NIEWOLD, 2007). Os antimicrobianos melhoradores do desempenho podem ser absorvidos como consequência do aumento da permeabilidade intestinal induzida pela inflamação (MacDONALD; MONTELEONE, 2005; NIEWOLD et al., 2000). Desta forma, os antimicrobianos podem ser acumulados nas células fagocitárias inflamatórias, atenuando a resposta inflamatória pela redução de citocinas pró-inflamatórias e resultando em reduzido estímulo catabólico, redirecionando nutrientes para o crescimento (COSTA et al., 2011; GRUYS et al. 2006). Embora neste estudo os β -ácidos do lúpulo não foram capazes de prevenir o pico de ativação dos fagócitos (explosão respiratória no sangue) no período imediatamente após o desmame, eles podem ter tido atividade anti-inflamatória no intestino dos leitões. Utilizando uma metodologia *ex vivo*, foi demonstrado que os β -ácidos do lúpulo reduziram a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias sem afetar a expressão de citocinas anti-inflamatórias no intestino de frangos, indicando sua habilidade em prevenir a super-ativação do sistema imune na mucosa intestinal (BORTOLUZZI et al., em fase de elaboração²). Também tem sido observado que os β -ácidos do lúpulo inibiram a inflamação local aguda em ratos (CLEEMPUT et al., 2009), assim como inibiram a inflamação induzida pelo fator da necrose tumoral α (TNF α) *in vitro* (CLEEMPUT et al., 2009; TANG et al., 2011). Portanto, este tópico deve ser investigado em estudos futuros usando β -ácidos do lúpulo como melhoradores de desempenho de leitões recém-desmamados.

Em contraste aos efeitos melhoradores da taxa de crescimento dos β -ácidos do lúpulo observados em frangos de corte (BOZKURT et al., 2009; CORNELISON et al., 2006) e em leitões recém-desmamados neste estudo com consumo de ração similar, efeitos inconsistentes de compostos bioativos derivados do lúpulo têm sido observados em outras espécies. Efeito depressivo do consumo voluntário de ração tem sido observado em coelhos alimentados com a flor do lúpulo (GRUESO et al., 2013) e em frangos de corte alimentados com β -ácidos do lúpulo (BORTOLUZZI et al., 2014), onde apenas a conversão alimentar foi melhorada. Não foram observados efeitos sobre o desempenho zootécnico de gado de corte alimentado com β -ácidos do lúpulo (WANG et al., 2010). Também, sem efeitos (YAJIMA et al., 2004) ou efeitos depressivos (SHIMURA et al., 2005; SUMIYOSHI; KIMURA, 2013) sobre o peso vivo de camundongos alimentados com dietas contendo α -ácidos do lúpulo foram relatados, mesmo com consumo de energia similar. Fatores relacionados com a concentração dos componentes bioativos do lúpulo, a sensibilidade ao oxigênio e instabilidade dos

² BORTOLUZZI, C. (Universidade de São Paulo); Menten, J.F.M. (Universidade de São Paulo); Silveira, H. (Universidade Federal de Lavras); Melo, A.D.B. (Pontífica Universidade Católica); Rostagno, M.H. (Purdue University). Hops β -acids (*Humulus lupulus*) decrease intestinal gene expression of proinflammatory cytokines in an *ex vivo* model.

componentes bioativos quando exposto ao ar e fatores que afetam a atividade antimicrobiana destes compostos bioativos (GARCÍA-VILLALBA et al., 2006; SIMPSON; SMITH, 1992), bem como seu acentuado sabor amargo, podem estar relacionadas a esta variabilidade observada nos resultados de experimentos com animais e devem ser levados em consideração em estudos futuros. No ensaio de aceitação realizado para o estabelecimento dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta testados neste estudo, foi observado que, quando os leitões possuíam livre escolha entre dietas contendo 0 ou 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo fornecidos em comedores separados (os quais tiveram sua posição alternada diariamente), a dieta com 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo contribuiu apenas com 37,27% do consumo voluntário total de ração. Entretanto, quando não foi dada a oportunidade de escolha para os leitões, não foram observados efeitos sobre o consumo de ração até níveis de 600 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta. O consumo de ração somente foi reduzido com níveis de 1.000 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta.

Em princípio, não foi encontrada uma explicação para o efeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre a ocorrência de diarreia neste estudo. Aparentemente, a maior ocorrência de diarreia nos níveis 120 e 240 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta não está relacionada a efeitos negativos sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes, peso dos órgãos e histologia do epitélio intestinal. A suplementação de flores do lúpulo para coelhos também não influenciou a produção de fezes líquidas, embora tenha diminuído a digestibilidade de nutrientes (GRUESO et al., 2013). Para frangos de corte, os β -ácidos do lúpulo também não afetaram os pesos do intestino delgado, pâncreas, fígado, gordura abdominal e Bursa de Fabricius (BOZKURT et al., 2009), além da histologia do intestino delgado (BORTOLUZZI et al., 2014).

Neste estudo, não houve influência dos aditivos testados na dieta sobre a diversidade da microbiota do intestino distal (íleo e ceco) de leitões recém-desmamados alimentados com dietas suplementadas com antimicrobiano ou β -ácidos do lúpulo em comparação ao tratamento controle negativo. A atividade antimicrobiana dos β -ácidos do lúpulo tem sido reportada *in vitro* (FLYTHER, 2009; FLYTHER; AIKEN, 2010) e *in vivo* (GRUESO et al., 2013; SIRAGUSA et al., 2008; TILLMAN et al., 2011). A adição de β -ácidos do lúpulo em dietas de frangos de corte, de maneira geral, também não afetou a microbiota, mas diminuiu a contagem de *Lactobacillus* e *Clostridium perfringens* no intestino delgado e cecos (SIRAGUSA et al., 2008; TILLMAN et al., 2011). Como os *Lactobacillus* ocupam um nicho ecológico na microbiota intestinal inibindo a colonização por microrganismos patogênicos (La RAGIONE et al., 2004), sua diminuição pode ser considerada indesejável para a saúde

intestinal. Entretanto, mesmo que os β -ácidos do lúpulo ou o antimicrobiano possam ter tido algum efeito inibitório no crescimento bacteriano neste estudo, estes aditivos não afetaram a diversidade microbiana na porção distal do intestino. De fato, há evidências de que os β -ácidos do lúpulo podem ser absorvidos, conforme demonstrou ensaio *in vitro* de transporte com células Caco-2 do intestino humano (CATTOOR et al., 2010). Portanto, apenas pequenas quantidades de princípio ativo poderiam estar disponíveis para promover alguma atividade antimicrobiana na porção distal do intestino dos leitões.

2.5 Conclusão

A inclusão de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) até 360 mg/kg na dieta aumentou a taxa de crescimento de leitões recém-desmamados por afetar a eficiência de utilização da dieta, como observado para o antimicrobiano (colistina) melhorador do desempenho. Portanto, os β -ácidos do lúpulo são promissores como aditivo melhorador do desempenho para leitões recém-desmamados. Entretanto, estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação dos β -ácidos do lúpulo com foco em atividade anti-inflamatória e efeitos sobre o metabolismo lipídico. Também, alguns cuidados quanto à estabilidade dos β -ácidos do lúpulo na dieta dos suínos, bem como suas características sensoriais acentuadas, devem ser levados em consideração em estudos futuros, especialmente no desenvolvimento de tecnologia de microencapsulação.

Referências

- AFIP. ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: AFIP, 1994. 274p.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). **Diseases in Asian Aquaculture**, 2nd ed. Manila: Metro Manila, 1995. p. 185–202.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 18th ed. Washington: AOAC, 2005. 2500p.
- BIAGI, G.; PIVA, A.; MOSCHINI, M.; VEZZALI, E.; ROTH, F.X. Performance, intestinal microflora, and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. **Journal of Animal Science**, Campaign, v. 85, p. 1184-1191, 2007.
- BORTOLUZZI, C.; MENTEN, J.F.M.; ROMANO, G.G.; PEREIRA, R.; NAPT, G.S. Effect of hops β -acids (*Humulus lupulus*) on performance and intestinal health of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, v. 23, p. 437-443, 2014.

BOSI, P.; MERIALDI, G.; SCANDURRA, S.; MESSORI, S.; BARDASI, L.; NISI, I.; RUSSO, D.; CASINI, L.; TREVISI, P. Feed supplemented with 3 different antibiotics improved food intake and decreased the activation of the humoral immune response in healthy weaned pigs but had differing effects on intestinal microbiota. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 4043-4053, 2011.

BOZKURT, M.; KÜÇÜKYILMAZ, K.; ÇATLI, A.U.; ÇINAR, M. Effect of dietary mannan oligosaccharide with or without oregano essential oil and hop extract supplementation on the performance and slaughter characteristics of male broilers. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 39, p. 223-232, 2009.

BRITTON, R.A.; YOUNG, V.B. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 20, p. 313-319, 2012.

BUCKWOLD, V.E.; WILSON, R.J.H.; NALCA, A.; BEER, B.B.; VOSS, T.G.; TURPIN, J.A.; BUCKHEIT, R.W.; WEI, J.; WENZEL-MATHERS, M.; WALTON, E.M.; SMITH, R.J.; PALLANSCH, M.; WARD, P.; WELLS, J.; CHUVALA, L.; SLOANE, S.; PAULMAN, R.; RUSSELL, J.; HARTMAN, T.; PTAK, R. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 61, p. 57-62, 2004.

CATTOOR, K.; BRACKE, M.; DEFORCE, D.; KEUKELEIRE, D.; HEYERICK, A. Transport of Hop Bitter Acids across Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 4132-4140, 2010.

CATTOOR, K.; DRESEL, M.; DE BOCK, L.; BOUSSERY, K.; VAN BOCXLAER, J.; REMON, J.P.; DE KEUKELEIRE, D.; DEFORCE, D.; HOFMANN, T.; HEYERICK, A. Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 7916-7924, 2013.

CLEEMPUT, M.V.; CATTOOR, K.; DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D.; HEYERICK, A. A Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 72, p. 1220-1230, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. 4th ed. Wayne, 2013. 73p.

CORNELISON, J.M.; YAN, F.; WATKINS, S.E.; RIGBY, L.; SEGAL, J.B.; WALDROUP, P.W. Evaluation of Hops (*Humulus lupulus*) as an antimicrobial in broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 5, p. 134-136, 2006.

COSTA, E.; UWIERA, R.R.E.; KASTELIC, J.P.; SELINGER, L.B.; INGLIS, G.D. Non-therapeutic administration of a model antimicrobial growth promoter modulates intestinal immune responses. **Gut Pathogens**, London, v. 3, p. 14, 2011.

CROMWELL, G.L. Why and how antibiotics are used in swine production. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, p. 7-27, 2002.

FLYTHER, M.D. The antimicrobial effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 48, p. 712-717, 2009.

FLYTHER, M.D.; AIKEN, G.E. Effects of hops (*Humulus lupulus* L.) extract on volatile fatty acid production by rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 109, p. 1169-1176, 2010.

GARCÍA-VILLALBA, R.; CORTACERO-RAMÍREZ, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; CONTRERAS, J.A.M.L.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of hop acids and their oxidized derivatives and iso- α -acids in beer by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 5400-5409, 2006.

GASKINS H.R.; COLLIER, C.T.; ANDERSON, D.B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, p. 29-42, 2002.

GRUESO, I.; DE BLAS, J.C.; CACHALDORA, P.; MENDEZ, J.; LOSADA, B.; GARCÍA-REBOLLAR, B. Combined effects of supplementation of diets with hops and of a substitution of starch with soluble fiber on feed efficiency and prevention of digestive disorders in rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 180, p. 92-100, 2013.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J.; VAN DIJK, R.; MELOEN, R.H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, Amsterdam, v. 108, p. 229-232, 2006.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, 2001. 9 p. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 11 nov. 2014.

KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA (Japan). MANABE, F.; TANIGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KATAYAMA, M. **Hop oxidation-reaction product, preparing method thereof and use thereof U.S. Patent 20130316023**. Dec 15, 2011. Nov 28, 2013a.

KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA (Japan). TANIGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; MANABE, F.; KATAYAMA, M. **Hop extract oxidation-reaction product, preparing method thereof and use thereof. U.S. Patent 20130316068**. Dez 15, 2011. Nov 28, 2013b.

LALLÈS, J.; BOSI, P.; SMIDT, H.; STOKES, C.R. Weaning - a challenge to gut physiologists. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 108, p. 82-93, 2007.

LA RAGIONE R.M.; NARBAD, A.; GASSON, M.J.; WOODWARD, M.J. *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 38, p. 197-205, 2004.

LAMY, V.; ROUSSI, S.; CHAABI, M.; GOSSÉ, F.; SCHALL, N.; LOBSTEIN, A.; RAUL, F. Chemopreventive effects of lupulone, a hop b-acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, p. 1575-1581, 2007.

MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, Washington, v. 307, p. 1920-1925, 2005.

MARION, J.; BIERNAT, M.; THOMAS, F.; SAVARY, G.; BRETON, Y.L.; ZABIELSKI, R.; LE HUËROU-LURON, I.; LE DIVIDICH, J. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 42, p. 339-354, 2002.

MATTERSON, L.D.; POTTER, L.M.; STUTZ, M.W.; SINGSEN, E.P. **The metabolizable energy of feed ingredients for chickens**. Storrs: University of Connecticut, 1965. 11p.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; XU, Y.; MCALLISTER, Z.T. Effects of hops on in vitro ruminal fermentation of diets varying in forage content. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 138, p. 193-201, 2011.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; XU, Z.; ALEXANDER, T.; GARDEN, S.; MCALLISTER, T. Effects of hop varieties on ruminal fermentation and bacterial community in an artificial rumen (rusitec). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 93, p. 45-52, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. 1998. **Nutrient requirements of swine**. 10th ed. Washington: NRC, 1998. 189p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. 2012. **Nutrient requirements of swine**. 11th ed. Washington: NRC, 2012. 400p.

NIWOLD, T.A.; VAN ESSEN, G.J.; NABUURS, M.J.A.; STOCKHOFF-ZURWIEDEN, N.; VAN DER MEULEN, J. A review of porcine pathophysiology: a different approach to disease. **Veterinary Quarterly**, London, v. 22, p. 209-212, 2000.

NIWOLD, T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, Oxford, v. 86, p. 605-609, 2007.

NOBLET, J.; SHI, X.S.; DUBOIS, S. 1993. Energy cost of standing activity in sows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 34, p. 127-136, 1993.

PERINA, D.P.; SBARDELLA, M.; ANDRADE, C.; BERENCHTEIN, B.; FREITAS, L.W.; AMIGO, C.R.; MIYADA, V.S. Effects of sorbitol or an antimicrobial agent on performance, diarrhea, feed digestibility, and organ weight of weanling pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 164, p. 144-148, 2014.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H.. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 51, p. 215-236, 1997.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements**. 3rd ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.

SBARDELLA, M.; BERENCHTEIN, B.; ANDRADE, C.; PERINA, D.P.; ALMEIDA, V.V.; MIYADA, V.S. Rice oil as a soybean oil replacement in weanling pig diets. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 145, p. 21-27, 2012.

SCHILLER, H.; FORSTER, A.; VONHOFF, C.; HEGGER, M.; BILLER, A.; WINTERHOFF, H. Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extracts. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 13, p. 535-541, 2006.

SHIMURA, M.; HASUMI, A.; MINATO, T.; HOSONO, M.; MIURA, Y.; MIZUTANI, S.; KONDO, K.; OIKAWA, S.; YOSHIDA, A. Isohumulones modulate blood lipid status through the activation of PPAR α . **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1736, p. 51-60, 2005.

SIRAGUSA, G.R.; HAAS, G.J.; MATHEWS, D.D.; SMITH, R.J.; BUHR, R.J.; DALE, N.M.; WISE, M.G. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract, jejunum and caecum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 61, p. 853-858, 2008.

SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Hop (*Humulus lupulus* L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 109, p. 162-172, 2013.

TAGASHIRA, M.; WATANABE, M.; UEMITSU, N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, New York, v. 59, p. 740-742, 1995.

TANG, W.; CHEN, L.H.; DAUN, H.; HO, C.T.; PAN, M.H. 2011. Inhibitory effects of hexahydro-b-acids in LPS-stimulated murine macrophage. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 3, p. 215-222, 2011.

TILLMAN, G.E.; HAAS, G.J.; WISE, M.G.; OAKLEY, B.; SMITH, M.A.; SIRAGUSA, G.R. Chicken intestine microbiota following administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 77, p. 395-403, 2011.

ZANOLI, P.; RIVASI, M.; ZAVATTI, M.; BRUSIANI, F.; BARALDI, M. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 102, p. 102-106, 2005.

YAJIMA, H.; IKESHIMA, E.; SHIRAKI, M.; KANAYA, T.; FUJIWARA, D.; ODAI, H.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; OIKAWA, S.; KONDO, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor {alpha} and {gamma} and reduce insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, p. 33456-33462, 2004.

SIMPSON, W.J.; SMITH, A.R.W. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. **Journal of Applied Bacteriology**, Hoboken, v. 72, p. 327-334, 1992.

WANG, Y.; CHAVES, A.V.; RIGBY, F.L.; HE, M.L.; MCALLISTER, T.A. Effects of hops on ruminal fermentation, growth, carcass traits and shedding of *Escherichia coli* of feedlot cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, p. 135-140, 2010.

3 β -ÁCIDOS DO LÚPULO (*Humulus lupulus*) NA DIETA DE SUÍNOS REDUZ GORDURA E AUMENTA PROTEÍNA NO MÚSCULO *Longissimus*³

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de níveis de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) na dieta sobre os atributos físicos, oxidação lipídica e composição do músculo *Longissimus* de suínos. Cento vinte e oito leitões recém-desmamados ($6,23 \pm 0,42$ kg de peso vivo) foram alojados em 8 blocos e alimentados com dietas contendo 0, 120, 240 ou 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias. No 35º dia de experimento, 8 machos castrados ($20,45 \pm 0,95$ kg de peso vivo) por tratamento foram abatidos para a coleta do músculo *Longissimus* para as análises. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos β -ácidos do lúpulo sobre os atributos físicos da carne. Efeito quadrático ($P < 0,05$) dos β -ácidos foi observado sobre os conteúdos de gordura, proteína e TBARS da carne, demonstrando que os níveis 176, 150 e 181 mg/kg de β -ácidos do lúpulo proporcionaram, respectivamente, 16,20% de redução na gordura, 1,95% de aumento na proteína e 23,31% de redução de TBARS. Portanto, a alimentação de suínos com β -ácidos do lúpulo reduz o conteúdo de gordura, aumenta o conteúdo de proteína e previne a oxidação lipídica da carne, sem afetar seus atributos físicos.

Destaque:

- β -ácidos do lúpulo na dieta reduzem gordura e aumentam proteína no músculo *Longissimus*.
- β -ácidos podem afetar a composição da carne por alterar o metabolismo lipídico *in vivo*.
- β -ácidos podem prevenir a oxidação lipídica da carne suína durante armazenamento.

Compostos químicos: lupulone (PubChem CID 68051); colupulone (PubChem CID 373677).

Palavras-chave: Aditivo natural; Deposição lipídica; Deposição proteica; Oxidação lipídica

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of dietary hop (*Humulus lupulus*) β -acids on physical attributes, lipid oxidation, and composition of pork *Longissimus* muscle. One hundred twenty-eight weanling pigs (6.23 ± 0.42 kg BW) were allotted to eight blocks and fed dietary 0, 120, 240 or 360 mg/kg hop β -acids during 35 d. Eight castrated males (20.45 ± 0.95 kg BW) per treatment were slaughtered to sample *Longissimus* muscle for analyses. No effects ($P > 0.05$) of hop β -acids were observed on meat physical attributes. Quadratic effects ($P < 0.05$) of hop β -acids were observed on fat, protein and TBARS-values of meat, showing that dietary levels of 176, 150 and 181 mg/kg of hop β -acids provided, respectively, 16.20% fat reduction, 1.95% protein accretion, and 23.31% TBARS reduction. Therefore, dietary hop β -acids fed to pigs reduce fat, increase protein, and prevent lipid oxidation, without affecting physical attributes of meat.

Highlights:

- Dietary hop β -acids reduce fat and increase protein of pork *Longissimus* muscle.
- Hop β -acids may affect pork meat composition by altering lipid metabolism *in vivo*.
- Hop β -acids may prevent lipid oxidation of pork *Longissimus* muscle during storage.

Chemical compounds: lupulone (PubChem CID 68051); colupulone (PubChem CID 373677).

Keywords: Natural feed additive; Lipid oxidation; Lipid accumulation; Protein accretion

³Versão em português do artigo submetido para apreciação do periódico "Meat Science" em 31/05/2014.

3.1 Introdução

Os aditivos modificadores de metabolismo e antioxidantes têm sido usados em dietas com o propósito de aumentar, respectivamente, a quantidade de carne magra na carcaça (ALMEIDA et al., 2013; KUTZLER et al., 2011) e o *status* antioxidante da carne (LAHUCKY et al., 2010; ROSSI et al., 2013). A carne suína é a segunda no *ranking* de susceptibilidade à oxidação lipídica (YI et al., 2013) devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (SHAHIDI; PEGG, 1994). A oxidação lipídica é um dos fatores mais importantes na deterioração da carne, afetando suas características sensoriais e nutricionais (MORRISSEY et al., 1998) e tendo efeito negativo para a saúde dos consumidores (ANGELI et al., 2011; VERBEKE et al., 1999). Entretanto, a demanda por produtos livres de aditivos sintéticos está aumentando devido a preocupações dos consumidores com a segurança alimentar (KARRE et al., 2013). Portanto, alternativas naturais para aumentar a deposição de carne magra na carcaça e o *status* antioxidante da carne suína carecem de ser desenvolvidas.

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.; Cannabaceae) possui uma diversidade de metabólitos secundários com propriedades funcionais, como ácidos amargos, óleos essenciais e flavonoides com aplicações no controle de doenças relacionadas ao estilo de vida e de inflamação, além de função antioxidante (BIENDL; PINZL, 2008; GERHAUSER et al., 2002). Patentes registradas têm atribuído aos ácidos amargos do lúpulo a propriedade de suprimir a absorção (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA, 2013b) e a deposição corporal (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA, 2013a) de gordura. De fato, α - e iso- α -ácidos do lúpulo têm demonstrado afetar o metabolismo lipídico, aumentando a β -oxidação de ácidos graxos no fígado (SHIMURA et al., 2005) e reduzindo o diâmetro dos adipócitos e o peso do tecido adiposo em camundongos (SUMIYOSHI; KIMURA, 2013; YAJIMA et al., 2004). Entretanto, não existe informação na literatura sobre os efeitos dos β -ácidos do lúpulo sobre a deposição de gordura corporal. Além disso, os β -ácidos do lúpulo têm demonstrando *in vitro* maior capacidade de remover radicais peroxil e hidroxila (sendo mais potentes para radicais peroxil) que os α -ácidos do lúpulo (VAN HOYWEGHEN et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2009). A remoção de radicais peroxil pela transferência de átomos de hidrogênio é um passo essencial para o bloqueio das reações em cadeia da oxidação lipídica (LAGUERRE et al., 2007; MACDONALD-WICKS et al., 2006). Portanto, foi hipotetizado que os β -ácidos do lúpulo poderiam suprimir a deposição de gordura corporal e prevenir a oxidação lipídica da carne suína.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de níveis de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) na dieta sobre os atributos físicos da carne (cor, pH, capacidade de retenção de água, perdas de peso por cozimento e força de cisalhamento), oxidação lipídica (mensurada como rancidez oxidativa de almôndegas pré-cozidas de carne durante o armazenamento refrigerado) e composição química (conteúdos de umidade, proteína e gordura e perfil de ácidos graxos) do músculo *Longissimus* de suínos.

3.2 Material e Métodos

Todos os procedimentos usando animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA / ESALQ / USP (Protocolo 2012-10).

Delineamento experimental, animais, tratamentos e dietas

Foram utilizados 128 leitões recém-desmamados ($6,23 \pm 0,42$ kg de peso corporal), distribuídos com base no sexo e peso corporal a 4 tratamentos com 8 repetições por tratamento e 4 animais por unidade experimental (baia).

Os tratamentos foram: 0 (controle), 120, 240 ou 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo adicionados às dietas basais. Estes níveis de β -ácidos do lúpulo foram estabelecidos com base em um ensaio de aceitação (os β -ácidos do lúpulo possuem sabor amargo que poderia afetar a palatabilidade da dieta) com o propósito de se obterem consumos de ração similares para todos os tratamentos. Os suínos foram alimentados à vontade com um programa nutricional de 3 fases, cujas dietas eram baseadas em milho, farelo de soja, produtos lácteos e plasma, durante 35 dias de período experimental. As dietas pré-inicial, inicial 1 e inicial 2 foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais dos suínos (ROSTAGNO et al., 2011) para, respectivamente, conter: 14,22, 14,12 e 13,51 MJ/kg de energia metabolizável; 20,9, 19,5 e 17,5 % de proteína bruta; e 1,45, 1,30 e 1,10 % de lisina digestível ileal. Foram supridas quantidades basais de 20 mg de α -tocoferol acetato e 4,32 mg de butil-hidroxitolueno (BHT) por kg de ração via premix vitamínico para, respectivamente, satisfazer as necessidades nutricionais em vitamina E dos suínos e prevenir a oxidação de vitaminas do premix.

*β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*)*

Os β -ácidos do lúpulo, como é conhecido o coletivo do lupulone ($C_{27}H_{38}O_4$), colupulone ($C_{26}H_{37}O_4$) e adlupulone ($C_{27}H_{38}O_4$), foram microencapsulados com celulose para conter 30% de β -ácidos totais (Hopsteiner, NY, EUA; Wallerstein, SP, Brasil). Os β -ácidos do

lúpulo são reconhecidos como GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) para uso como agentes antimicrobianos em salsichas e carnes cozidas (GRN nº63, Food and Drug Administration, EUA) e podem ser considerados seguros para humanos e animais.

Procedimento experimental

No 35º dia do período experimental, um macho castrado ($20,45 \pm 0,95$ kg) com peso corporal próximo ao peso corporal médio dos animais de cada baia (totalizando 8 animais por tratamento) foi abatido, seguindo métodos humanitários (insensibilização via corrente elétrica seguida por exsanguinação). Após o abate, amostras do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (referido como “músculo *Longissimus*” neste artigo) foram coletadas para as análises de atributos físicos (cor, pH, capacidade de retenção de água, perdas de peso por cozimento e força de cisalhamento), oxidação lipídica (mensurada como rancidez oxidativa) e composição química (conteúdo de umidade, gordura e proteína e perfil de ácidos graxos) da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado.

Atributos físicos da carne

O músculo *Longissimus* foi resfriado a 4°C e cortado 24 horas *post-mortem* para a realização das análises físicas. A cor da carne foi mensurada em bifes de carne após exposição ao ar por 20 min. à temperatura de 10°C, sem exposição à luz, usando um colorímetro portátil Konika Minolta (Chroma Meter CR-400, Konika Minolta Sensing Inc, Japão). A mensuração da cor (sistema CIELAB baseado em L^* = luminosidade; a^* = intensidade de vermelho; b^* = intensidade de amarelo) foi realizada aleatoriamente em triplicata em cada bife. Para a determinação do pH, foram realizadas 3 mensurações aleatórias em cada bife usando um pHmetro portátil com sonda de penetração (Testo 205, Testo Limited, Hampshire, UK). Cubos de carne de 2 g (em duplicata), colocados no centro de papel filtro, foram prensados entre placas de vidro (15 cm x 15 cm x 8mm) com 10 kg de pressão por 5 min. para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA), representada como a porcentagem de água extraível (GOERL et al., 1995; HAMM, 1960). Cubos de carne de 2,5 x 2,5 x 2,5 cm foram pesados e cozidos em um forno elétrico industrial pré-aquecido à temperatura de 170°C até atingirem a temperatura interna de 70°C, monitorada com um termômetro (Testo 922, Limited, Hampshire, UK) conectado a uma sonda inserida no centro dos cubos de carne. Após o cozimento, os cubos de carne foram resfriados à temperatura ambiente e pesados novamente para o cálculo das perdas de peso por cozimento através da divisão do peso cozido pelo peso

cru. Uma amostra de 1,27 cm de diâmetro foi removida de cada cubo de carne cozido, paralelamente ao comprimento das fibras musculares, e cortada perpendicularmente às fibras musculares com um aparelho de cisalhamento Warner-Bratzler (Modelo 235 6X, GR Manufacturing Co., Manhattan, KS) com uma lâmina tipo V (1,016 cm de espessura e velocidade constante de 200 mm/min.), sendo a força de cisalhamento reportada em Newton (N).

Oxidação lipídica da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado

O músculo *Longissimus* foi empacotado a vácuo e armazenado por 180 dias à -20°C antes do ensaio de armazenamento refrigerado. Após isso, foram preparadas almôndegas pré-cozidas de carne, utilizando o procedimento padrão descrito por Racanicci et al. (2004, 2011). O músculo *Longissimus* dos 8 leitões machos castrados de cada tratamento foi aparado de todo tecido conjuntivo e gordura subcutânea, fatiado, picado e misturado com 0,50% de sal. As almôndegas de carne (30,00±0,50 g) foram empacotadas a vácuo em sacos com baixa permeabilidade ao oxigênio e cozidas em água fervente à 100°C por 8 min. Após resfriamento em gelo, as almôndegas de carne foram re-empacotadas em sacos com alta permeabilidade ao oxigênio e armazenadas no escuro à 4°C por até 8 dias. A oxidação lipídica foi mensurada através da quantificação de produtos secundários da oxidação lipídica nos dias 0, 3, 6 e 8 de armazenamento refrigerado, utilizando o método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (MADSEN et al., 1998). Para cada dia, duas almôndegas de carne por tratamento foram analisadas em duplicata. Foram adicionados 15 µL de solução de TCA (7,5% de ácido tricloroacético, 0,1% de EDTA e 0,1% de galato de propilo, todos oriundos da Merck) a 5,00 g de carne, misturados (45 s e 13.500 RPM em um Ultra-Turrax T-25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanha) e filtrados. Cinco µL do filtrado foram misturados a 5,00 mL de solução 0,02 M de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) (Merck), sendo deixado ocorrer a reação em água fervente à 100°C por 40 min. A absorbância foi mensurada a 532 e 600 nm, usando um espectrofotômetro de UV (UV-340G, Ind. Com. Eletro Eletrônica Gehaka, São Paulo, Brasil), sendo a diferença (A532 nm - A600 nm) usada como valor de absorbância corrigido para turbidez. Os resultados foram expressos em mg de malondialdeído (MDA) por kg de carne, usando uma curva padrão (0,1–6,0 nM) estabelecida com 1,1,3,3-tetra-etóxi-propano (TEP da Merck).

Mudanças no conteúdo de umidade, gordura e proteína da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado

Três amostras das almôndegas de carne de cada tratamento dos dias 0 e 8 de armazenamento refrigerado foram usadas para a determinação dos conteúdos de umidade, gordura e proteína. A umidade foi determinada à 105°C por 3h em um Dryer HCl Filter (Modelo RD2, Ankom). A extração de gordura em solvente hexano foi realizada à 90°C durante 1h em um sistema de extração (Modelo XT10, Ankom), de acordo ao método 5-04 da AOCS (1998) para a determinação do conteúdo de gordura. A quantidade total de nitrogênio foi determinada por combustão (Modelo FP-528, Leco) de acordo ao método BA 4F-00 da AOCS (1998) e utilizando 6,25 como fator para o cálculo da proteína bruta.

Mudanças no perfil de ácidos graxos da fração de gordura da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado

Para a composição de ácidos graxos, a extração de gordura foi realizada em duas amostras de almôndega de carne de cada tratamento coletadas nos dias 0 e 8 de armazenamento refrigerado, de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959) com uma modificação na etapa de agitação (Ultra Turrax, IKA, modelo T25 digital). Após metilação (HARTMAN; LAGO, 1973), o perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos de acordo ao método 1-62 da AOCS (1998). O cromatógrafo gasoso (Modelo AF2010, Shimadzu Corp., Japão) era equipado com um injetor automático (Modelo AOC 20i, Shimadzu Corp., Japão), um detector de ionização de chama e uma coluna capilar altamente polar de bis-cianopropil polisiloxano com 0,20 µm, 100 x 0,25 mm i.d. (SP 2560, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As amostras foram injetadas (1,0 µL; split 100:1) sob condições controladas: temperatura de injeção de 250°C; oven temperature 140°C (5 min.), 140–240°C à 4°C por min., 240°C (15 min.); temperatura do detector de 260°C; e hélio à 19,5 cm/sec. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões externos (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e quantificados com base na relação entre a área de cada ácido graxo com a área dos padrões internos (metiltridecanoato), considerando o fator de correção da resposta do detector de ionização de chama e a conversão dos ésteres metílicos de ácidos graxos em ácidos graxos. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) do conteúdo total de ácidos graxos.

Delineamento experimental e análise estatística

O procedimento MIXED do SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, EUA) foi utilizado para ANOVA, considerando um delineamento experimental inteiramente

casualizado de acordo ao modelo: $Y(ij) = \mu + l(i) + \varepsilon(ij)$, onde $Y(ij)$ é a resposta dependente, μ é a média geral, $l(i)$ é o efeito fixo dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta ($i=1, \dots, 4$) e $\varepsilon(ij)$ é o erro experimental.

Os dados de atributos físicos da carne foram analisados usando ANOVA com um fator, onde os tratamentos foram o fator principal e o músculo *Longissimus* de cada animal abatido (um macho castrado por baia) foi considerado uma unidade experimental, totalizando 8 repetições por tratamento. Os dados oriundos do ensaio de armazenamento refrigerado foram analisados usando ANOVA com dois fatores, onde foi adicionado o tempo de armazenamento como efeito aleatório no modelo matemático e as almôndegas de carne (feitas da mistura do músculo *Longissimus* dos 8 machos castrados abatidos por tratamento) foram consideradas como unidades experimentais, totalizando 4 repetições para os dados de TBARS, duas repetições para o perfil de ácidos graxos e 3 repetições para os conteúdos de umidade, gordura e proteína da carne por tratamento por dia de armazenamento refrigerado.

ANOVA ($P \leq 0,05$) e LSMEANS são apresentados nas tabelas. O teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias dos dados de TBARS dos tratamentos. Contrastes ortogonais e regressão polinomial foram usados para a determinação da resposta dose-dependente das variáveis aos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta.

3.3 Resultados

Atributos físicos da carne

Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre a cor, pH, capacidade de retenção de água, perdas de peso por cozimento e força de cisalhamento do músculo *Longissimus* (Tabela 3.1).

Mudanças no conteúdo de umidade, gordura e proteína da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado

Foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) dos níveis de β -ácidos do lúpulo sobre o conteúdo de gordura das almôndegas de carne suína (na base seca), permitindo estimar 176 mg/kg como sendo o nível de β -ácidos do lúpulo na dieta com maior redução (16,20%) do conteúdo de gordura da carne (Tabela 3.2). Todos os animais receberam a mesma quantidade de óleo de soja (1,75%) na dieta com o propósito de atender às exigências energéticas dos suínos. Não foram observados efeitos dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o

consumo de ração (dados não mostrados), portanto os animais tiveram consumo similar de nutrientes e energia durante todo o experimento.

Tabela 3.1 - Cor (L*, a* e b*), pH, capacidade de retenção de água (CRA), perdas de peso por cozimento (PC) e força de cisalhamento (FC) do músculo *Longissimus* de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dia^a

Item	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				EPM	CV	P=
	0	120	240	360			
L*	36,54	36,98	37,96	36,68	7,42	41,25	0,98
a*	5,79	5,56	5,39	5,33	0,26	15,49	0,51
b*	3,78	3,97	4,22	3,94	0,94	43,45	0,33
pH	5,51	5,49	5,47	5,46	0,04	1,49	0,27
CRA, %	29,97	32,28	31,40	34,55	1,56	11,42	0,26
PC, %	23,25	23,87	24,39	24,33	1,43	16,84	0,93
FC, Newton	45,17	41,23	36,81	44,26	9,94	42,74	0,48

^aOs valores são LSMEANS de 8 animais por nível de β -ácidos do lúpulo na dieta.

Tabela 3.2 - Conteúdo de umidade (UM), gordura (GB) e proteína (PB) das almôndegas de carne de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias nos dias 0 e 8 do ensaio de armazenamento refrigerado^a

Item	Dia	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg						Valor de P do modelo		
		0	120	240	360	Média	SEM	Nível	Dia	Nível*Dia
UM, %	0	68,51	68,09	68,97	69,94	68,88	0,13	<0,01	<0,01	<0,01
	8	68,53	69,74	69,79	70,05	69,53				
	Média ^b	68,52	68,92	69,38	69,99					
GB, %	0	6,19	5,44	5,39	6,87	5,97	0,18	<0,01	0,13	0,18
	8	6,30	5,36	5,21	5,89	5,69				
	Média ^c	6,24	5,40	5,30	6,38					
PB, %	0	27,28	28,98	28,29	26,80	27,84	0,23	<0,02	0,05	<0,01
	8	28,50	28,57	27,56	28,63	28,32				
	Média ^d	27,89	28,77	27,93	27,72					

^aOs valores são LSMEANS de 3 replicatas por nível de β -ácidos do lúpulo na dieta.

^bEfeito linear dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de umidade das almôndegas de carne suína
($y = 0,00405833x + 68,472$; $R^2 = 0,99$; $P < 0,001$).

^cEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de gordura das almôndegas de carne suína
($y = 0,00003333x^2 - 0,01173333x + 6,262$; $R^2 = 0,99$; $P < 0,001$).

^dEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de proteína das almôndegas de carne suína
($y = -0,00001892x^2 + 0,0056875x + 28,0075$; $R^2 = 0,58$; $P < 0,03$).

Foi observada interação ($P < 0,01$) entre os níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta e o tempo de armazenamento para os conteúdos de umidade e proteína das almôndegas de carne (Tabela 3.2). O aumento dos níveis de β -ácidos na dieta aumentou linearmente o conteúdo de umidade das almôndegas de maneira mais intensa no dia 8 que no dia 0 de armazenamento. No dia 0 e na média do armazenamento, foi observado efeito quadrático ($P < 0,03$) dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de proteína das almôndegas, permitindo estimar 150 mg/kg como o nível calculado de β -ácidos do lúpulo na dieta com maior aumento do conteúdo (1,95%) de proteína nas almôndegas de carne. Entretanto, no dia 8 de armazenamento, o conteúdo de proteína das almôndegas apresentou comportamento cúbico, não sendo consistente com o dia 0 e a média do armazenamento, o que pode ter ocorrido devido a mudanças na dinâmica de atividade de água durante o armazenamento das almôndegas de carne.

Mudanças no perfil de ácidos graxos da fração de gordura da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado

Não foram observadas interações ($P > 0,05$) entre os níveis de β -ácidos do lúpulo e o tempo de armazenamento refrigerado para os conteúdos de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) da fração de gordura das almôndegas de carne (Tabela 3.3). Resposta quadrática ($P < 0,01$) foi observada para os conteúdos de SFA, PUFA e PUFA/SFA da fração de gordura das almôndegas de carne, enquanto o conteúdo de MUFA aumentou linearmente ($P < 0,001$). A maior mudança do perfil de ácidos graxos ocorreu no tratamento 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta, principalmente devido a mudanças no conteúdo de ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) da fração de gordura da carne (Tabela 3.4).

Oxidação lipídica da carne durante ensaio de armazenamento refrigerado

Um discreto aumento linear ($P < 0,001$) nos valores de TBARS nas almôndegas de carne crua foi observado com o aumento dos níveis de β -ácidos na dieta. Entretanto, mesmo que o cozimento tenha aumentado os valores de TBARS das almôndegas de carne em todos os tratamentos, imediatamente após o cozimento (dia 0 de armazenamento) os valores de TBARS foram similares ($P > 0,05$) para todos os tratamentos (Tabela 3.5). Durante os 8 dias de armazenamento refrigerado, os valores de TBARS aumentaram ($P < 0,001$) para todos os tratamentos (Figura 3.1). Foi observado efeito quadrático ($P < 0,001$) dos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta sobre os valores de TBARS nos dias 3, 6 e 8 do ensaio de armazenamento

refrigerado, permitindo estimar o nível de 181 mg/kg como o nível calculado de β -ácidos do lúpulo na dieta com maior redução (23,31%) dos valores de TBARS na carne.

Tabela 3.3 - Perfil de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) (% do total de ácidos graxos) de almôndegas de carne de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias nos dias 0 e 8 do ensaio de armazenamento refrigerado^a

Item	Dia	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				Média	EPM	Valor de P do modelo		
		0	120	240	360			Nível	Dia	Nível*Dia
SFA, %	0	34,34	33,11	33,44	34,53	33,85	0,35	0,04	<0,01	0,14
	8	35,95	36,40	35,53	36,59	36,11				
	Média ^b	35,14	34,75	34,48	35,56					
MUFA, %	0	37,05	37,51	37,64	39,40	37,90	0,36	<0,01	<0,01	0,77
	8	38,44	38,38	38,39	40,70	38,98				
	Média ^c	37,74	37,94	38,01	40,05					
PUFA, %	0	28,63	29,40	28,93	26,07	28,26	0,49	<0,01	<0,01	0,54
	8	25,62	25,23	26,09	22,71	24,91				
	Média ^d	27,12	27,31	27,51	24,39					
PUFA/SFA	0	0,84	0,89	0,87	0,76	0,84	0,02	<0,01	<0,01	0,38
	8	0,71	0,70	0,74	0,62	0,69				
	Média ^e	0,77	0,79	0,80	0,69					

^aOs valores são LSMEANS de 2 replicatas por nível de β -ácidos do lúpulo na dieta.

^bEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de SFA das almôndegas de carne (P<0,01).

^cEfeito linear dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de MUFA das almôndegas de carne (P<0,001).

^dEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de PUFA das almôndegas de carne (P<0,001).

^eEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre o conteúdo de PUFA/SFA das almôndegas de carne (P<0,001).

Tabela 3.4 - Perfil de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) das almôndegas de carne de suínos machos castrados alimentados, com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo durante 35 dias no dia 0 e 8 do ensaio de armazenamento refrigerado^a

Item	Dia 0 de armazenamento				Dia 8 de armazenamento				SEM
	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				
	0	120	240	360	0	120	240	360	
C14:0	1,59	0,95	1,65	1,76	1,57	0,91	1,76	1,00	0,42
C14:1	1,58	1,68	1,52	1,49	1,59	0,72	1,47	0,71	0,26
C16:0	24,44	23,41	23,11	23,89	25,28	25,43	24,70	26,20	0,26
C16:1	2,42	2,62	2,59	2,65	2,48	1,37	3,28	1,37	0,52
C18:0	8,31	8,75	8,68	8,88	9,10	10,06	9,07	9,40	0,45
C18:1	33,05	33,21	33,53	35,27	34,37	36,30	33,64	38,63	0,81
C18:2	24,01	24,75	24,18	21,71	22,16	23,66	22,51	21,11	0,48
C20:3	4,62	4,66	4,75	4,37	3,46	1,57	3,58	1,60	0,58

^aOs valores são a média de 2 replicatas por nível de β -ácidos do lúpulo na dieta.

Tabela 3.5 - Produtos secundários da oxidação lipídica, mensurados como TBARS (mg de MDA/kg de carne) durante armazenamento refrigerado à 4°C, em almôndegas de carne crua e pré-cozidas de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo^a

	Níveis de β -ácidos na dieta, mg/kg				Média	SEM	Valor de P do modelo		
	0	120	240	360			Níveis	Dias	Níveis*Dias
Cruas ^b	0,07	0,08	0,09	0,09	0,08	0,02	<0,01	-	-
Dias									
0	0,41a	0,42a	0,34a	0,49a	0,41	0,02	<0,01	<0,01	<0,01
3 ^c	2,60a	1,85c	1,81c	2,55b	2,20	0,05			
6 ^c	3,35a	2,49b	2,68b	3,16a	2,92	0,06			
8 ^c	3,67a	3,02c	3,27b	3,68a	3,41	0,04			
Média ^d	2,51	1,95	2,03	2,47					

^aOs valores são LSMEANS de 4 almôndegas de carne por nível de β -ácidos do lúpulo na dieta.

LSMEANS com letras diferentes, em cada linha, diferem ($P \leq 0,05$).

^bEfeito linear dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre os valores de TBARS das almôndegas de carne crua ($y = 0,0008x + 1,0181$; $R^2 = 0,93$; $P < 0,001$).

^cEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre os valores de TBARS das almôndegas de carne pré-cozidas ($P < 0,001$).

^dEfeito quadrático dos β -ácidos do lúpulo na dieta sobre os valores de TBARS das almôndegas de carne pré-cozidas ($y = 0,00024219x^2 - 0,08759583x + 34,6085$; $R^2 = 0,98$; $P < 0,001$).

Figura 3.1 - Progressão da oxidação lipídica (TBARS) durante o período de armazenamento refrigerado à 4°C em almôndegas de carne de suínos machos castrados, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de β -ácidos do lúpulo

3.4 Discussão

Independentemente das patentes registradas sobre acúmulo de gordura (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA, 2013a,b) e da redução de tecido adiposo observada em camundongos (SHIMURA et al., 2005; SUMIYOSHI; KIMURA, 2013; YAJIMA et al., 2004), este estudo é o primeiro a demonstrar o potencial dos β -ácidos do lúpulo em reduzir o conteúdo de gordura e aumentar o conteúdo de proteína do músculo *Longissimus* de suínos. Neste estudo, a carne de suínos alimentados com dietas contendo β -ácidos do lúpulo apresentou até 16,20% menos gordura e 1,95% mais proteína. Entretanto, não existe uma explicação clara para o aumento do conteúdo de gordura e diminuição do conteúdo de proteína observado para o maior nível de β -ácidos do lúpulo na dieta (360 mg/kg). Com base na teoria da dessensibilização dos receptores celulares β dependente da dose e tempo de exposição aos agonistas adrenérgicos como a ractopamina (JOHNSON, 2006; MILLS, 2002), que tem sua resposta atenuada com a exposição prolongada (ALMEIDA et al., 2013), os receptores celulares para os β -ácidos do lúpulo também podem possuir um mecanismo de regulação similar. Além disso, uma vez que a relação energia:proteína foi a mesma para todos os tratamentos e que os suínos apresentaram consumos de ração similar (portanto, com padrão isonutricional), a relação ideal de energia:proteína pode não ter sido atendida para os suínos alimentados com o nível 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta. A mudança na relação ideal de energia:proteína na dieta de animais alimentados com dietas contendo aditivos modificadores de metabolismo (por exemplo, ractopamina) se deve a menor quantidade de energia necessária para deposição corporal de músculo do que para deposição de gordura corporal (SCHINCKEL et al., 2003). Relação inadequada de energia:proteína na dieta aumenta a deposição de gordura na carcaça de suínos (CHEN et al., 1995; ESSEN-GUSTAVSSON et al., 1992). Portanto, além da dessensibilização dos receptores celulares, mudanças na relação ideal de energia:proteína na dieta poderiam explicar o maior conteúdo de gordura e menor de proteína na carne quando os leitões foram alimentados com dietas contendo 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo.

O potencial dos aditivos à base de plantas em reduzir o conteúdo de gordura e aumentar o conteúdo de proteína no tecido muscular também foi demonstrado para suínos alimentados com dietas contendo pó de chá verde, com redução de 20% no conteúdo de gordura e aumento de 3,5% no conteúdo de proteína do músculo *Longissimus* (SARKER et al., 2010), possivelmente devido a um efeito inibitório da lipogênese (IKEDA et al., 1992). Os α - e iso- α -ácidos do lúpulo têm demonstrado atividade antagonista ao receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR α) no fígado (SHIMURA et al., 2005) e inibição da

expressão do receptor PPAR γ nos adipócitos de camundongos (SUMIYOSHI; KIMURA, 2013). Receptores PPARs são reconhecidos por afetar o metabolismo lipídico e, especificamente o PPAR α , por aumentar a β -oxidação de ácidos graxos no fígado. De fato, estas mudanças na expressão dos receptores PPARs em camundongos foram associadas a menor deposição de gordura nos adipócitos através da redução da diferenciação e do diâmetro celular, resultando em redução do peso do tecido adiposo (SHIMURA et al., 2005; SUMIYOSHI; KIMURA, 2013; YAJIMA et al., 2004). Shimura et al. (2005) demonstraram que camundongos desprovidos dos receptores PPAR α não apresentaram o mesmo padrão de metabolismo lipídico quando comparados aos camundongos normais em resposta à suplementação de α -ácidos do lúpulo. Assim, a ativação da β -oxidação no fígado de camundongos alimentados com α -ácidos do lúpulo pode ter sido o principal mecanismo pelo qual o diâmetro dos adipócitos foi reduzido (YAJIMA et al., 2004). Portanto, os β -ácidos do lúpulo podem afetar a deposição intramuscular de gordura através do redirecionamento da gordura para a via de oxidação hepática, conforme observado para os α -ácidos do lúpulo. Esta hipótese é suportada pela observação da alta similaridade das estruturas moleculares dos α -, iso- α - e β -ácidos do lúpulo e dos metabólitos e produtos formados pela sua oxidação em ensaio de incubação microssomal (CATTOOR et al., 2013). De fato, tem sido sugerido que a cadeia lateral dos α -ácidos do lúpulo está envolvida na ativação dos receptores PPAR α (YAJIMA et al., 2004) e, uma vez que a cadeia lateral dos β -ácidos é a mesma que a dos α -ácidos do lúpulo, os β -ácidos também poderiam ativar os receptores PPAR α .

A modificação do metabolismo lipídico pode estar redirecionando energia para a deposição proteica no tecido muscular, uma vez que a redução no conteúdo de gordura esteve relacionada ao aumento no conteúdo de proteína nas almôndegas de carne. Tais relações entre conteúdos de umidade, gordura e proteína do músculo também foram reportadas previamente (FUENTES et al., 2014; SARKER et al., 2010). Entretanto, independente das diferenças de gordura, proteína e umidade do músculo *Longissimus*, não foram observadas mudanças nos atributos físicos da carne neste experimento. Este fato pode estar relacionado à alta variabilidade destes parâmetros (LENTH, 2007). No presente estudo, numericamente foi observada neste estudo uma relação entre altos valores de luminosidade (“L*”) com reduzido conteúdo de gordura na carne, que é consistente com elevadas refletâncias mensuradas em carne com elevados conteúdos de gordura (GOERL et al., 1995). Relações entre reduzido conteúdo de gordura e aumento na força de cisalhamento também têm sido reportadas (GOERL et al., 1995), porém não observadas neste estudo. Os valores de pH e cor observados neste estudo estão dentro do padrão esperado para carne suína (RYU; KIM, 2005). Conforme

descrito para suínos alimentados com outros aditivos à base de plantas, em que não foram observados efeitos sobre o pH (GRELA, 2000; LAHUCKY et al. 2010; PEETERS et al., 2006; ROSSI et al., 2013), a cor (HAAK et al., 2008; LAHUCKY et al. 2010; ROSSI et al., 2013; SARKER et al., 2010), as perdas de peso por cozimento e força de cisalhamento (LAHUCKY et al., 2010; ROSSI et al., 2013; SARKER et al., 2010), os β -ácidos na dieta também não afetaram os atributos físicos da carne.

Neste estudo, a extensão da oxidação lipídica, apresentada como a concentração de malondialdeído (MDA) no músculo *Longissimus*, foi diminuída em 23% com o nível de 181 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta. Entretanto, os valores de TBARS excederam o limiar da sensibilidade humana ao ranço, que fica em torno de 0,70 a 1,45 mg MDA/kg de carne (LANARI et al., 1995), dentro dos 3 primeiros dias de armazenamento. Portanto, o potencial dos β -ácidos do lúpulo em aumentar a estabilidade oxidativa da carne suína é bastante limitado comparado a outros antioxidantes à base de plantas, como alecrim (LOPEZ-BOTE et al., 1998), orégano (BOTSOGLU et al., 2002), timol e carvacrol (LUNA et al., 2010), extrato de folhas de mostarda *kimchi* (LEE et al., 2010), extrato de groselha preta (JIA et al., 2012), amoras (GANHÃO et al., 2013) e oliva (BOTSOGLU et al., 2012). É importante ressaltar que efeito similar de antioxidantes naturais comparados a sintéticos tem sido descrito (JIA et al., 2012; LUNA et al., 2010), demonstrando o potencial de antioxidantes baseados em plantas em prevenir a oxidação lipídica da carne. Até o presente momento, não existe na literatura estudos usando β -ácidos do lúpulo e outros componentes do lúpulo sobre a estabilidade oxidativa de carne. Ensaio *in vitro* tem demonstrado que a capacidade antioxidante dos ácidos amargos do lúpulo são inferiores aos flavonoides derivados do lúpulo como o xanthohumol (GERHAUSER et al., 2002; MIRANDA et al., 2000; VAN HOYWEGHEN et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2009), o qual pode ter potencial para compor um aditivo natural com os β -ácidos para melhorar tanto a deposição de carne magra na carcaça quanto o *status* antioxidante da carne.

A redução nos valores de TBARS, observada neste estudo, parece estar relacionada à redução do conteúdo de gordura da carne. Quando baixos conteúdos de gordura foram observados, também foram observados baixos valores de TBARS, como previamente descrito na literatura (FUENTES et al., 2014; SASAKI et al., 2001). Portanto, o menor conteúdo de TBARS na carne pode ser resultado do seu menor conteúdo de gordura. Além disso, a atividade antioxidante parece ser dose-dependente. Contrariamente ao ácido ascórbico, que, em baixos níveis, estimula e, em altos níveis, previne a oxidação lipídica (DECKER; XU, 1998), os β -ácidos do lúpulo apresentaram um efeito dose-dependente contrário neste estudo.

No presente estudo, o conteúdo de SFA nas almôndegas de carne apresentou resposta quadrática aos níveis de β -ácidos do lúpulo na dieta, similarmente ao efeito comportamental observado para o conteúdo de gordura e os valores de TBARS, como esperado. De maneira geral, o aumento de SFA no perfil de ácidos graxos das almôndegas de carne pode ser uma consequência de um aumento da oxidação de PUFA (SHAHIDI; PEGG, 1994). O nível 360 mg/kg de β -ácidos do lúpulo na dieta acarretou o menor conteúdo de PUFA e maior conteúdo de MUFA e SFA, consistentemente com os altos valores de TBARS. Como com o aumento dos níveis de β -ácidos na dieta houve aumento dos valores de TBARS da carne crua, se pode supor que o perfil de ácidos graxos foi alterado mesmo antes do processo de cozimento, ou seja, durante o período de 180 dias de armazenamento em vácuo à -20°C .

3.5 Conclusão

A alimentação de suínos com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) reduz o conteúdo de gordura, aumenta o conteúdo de proteína e previne a oxidação lipídica do músculo *Longissimus*, sem afetar os atributos físicos da carne suína. Os β -ácidos do lúpulo parecem ser um aditivo modificador natural do metabolismo dos suínos que pode ser utilizado para aumentar a deposição de carne magra na carcaça. Entretanto, são necessários estudos para a elucidação dos mecanismos de ação e para o estabelecimento de uma forma prática para a sua suplementação na dieta. Alguns cuidados referentes à estabilidade dos β -ácidos do lúpulo na dieta precisam ser levados em consideração em estudos futuros, principalmente no desenvolvimento de tecnologia de microencapsulação.

Referências

- ALMEIDA, V.V.; NUÑEZ, A.J.C.; SCHINCKEL, A.P.; ANDRADE, C.; BALIEIRO, J.C.C.; SBARDELLA, M.; MIYADA, V.S. Time-response relationship of ractopamine feeding on growth performance, plasma urea nitrogen concentration, and carcass traits of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 811-818, 2013.
- ANGELI, J.P.; GARCIA, C.C.; SENA, F.; FREITAS, F.P.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P. Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 51, p. 13, 2011.
- AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, 5th ed. Champaign: AOCS, 1998.

BIENDL, M.; PINZL, C. **Hops and Health**. Germany: Deutsches Hopfenmuseum, 2008. 123p.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOTSOGLU, N.A.; CHRISTAKI, E.; FLETOURIS, D.J.; FLOROU-PANERI, P.; SPAIS, A.B. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 62, p. 259-265, 2002.

BOTSOGLU, E.; GOVARIS, A.; AMBROSIADIS, I.; FLETOURIS, D. Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europea* L.) or α -tocopheryl acetate. **Meat Science**, Amsterdam, v. 92, p. 525-532, 2012.

CATTOOR, K.; DRESEL, M.; DE BOCK, L.; BOUSSERY, K.; VAN BOCXLAER, J.; REMON, J.P.; DE KEUKELEIRE, D.; DEFORCE, D.; HOFMANN, T.; HEYERICK, A. Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 7916-7924, 2013.

CHEN, H.Y.; MILLER, P.S.; LEWIS, A.J.; WOLVERTON, C.K.; STROUP, W.W. Changes in plasma urea concentration can be used to determine protein requirements of two populations of pigs with different protein accretion rates. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2631, 1995.

DECKER, E.A.; XU, Z. Minimizing rancidity in muscle foods. **Food Technology**, Chicago, v. 52, p. 54-59, 1998.

ESSEN-GUSTAVSSON, B.; KARLSSON, A.; LUNDSTROM, K.; ENFALT, A.C. Intramuscular fat content and lipid in muscle fibers of pigs fed high and low protein diet and relation to meat quality. In: PUOLANNE, E.; DEMEYER, D.I. (Ed.). **Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors**. Trowbridge: Redwood Books, 1992. p. 41-44.

FUENTES, V.; ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, J.; VENTANAS, S. Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 147, p. 70-77, 2014.

GANHÃO, R.; ESTÉVEZ, M.; ARMENTEROS, M.; MORCUENDE, D. Mediterranean Berries as Inhibitors of Lipid Oxidation in Porcine Burger Patties Subjected to Cooking and Chilled Storage. **Journal of Integrative Agriculture**, Amsterdam, v. 12, p. 1982-1992, 2013.

GERHAUSER, C.; ALT, A.; HEISS, E.; GAMAL-ELDEEN, A.; KLIMO, K.; KNAUFT, J.; NEUMANN, I.; SCHERF, H.R.; FRANK, N.; BARTSCH, H.; BECKER, H. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 1, p. 959-969, 2002.

GOERL, K.F.; EILERT, S.J.; MANDIGO, R.W.; CHEN, H.Y.; MILLER, P.S. Pork characteristics as affected by two populations of swine and six crude protein levels. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 3621-3626, 1995.

GRELA, E.R. Influence of herb supplements in pig feeding on carcass traits and some organoleptic and chemical parameters of meat. **Roczniki Naukowe Zootechniki**, Balice, v. 6, p. 167-171, 2000.

HAAK, L.; RAES, K.; VAN DYCK, S.; DE SMET, S. Effect of dietary rosemary and α -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. **Meat Science**, Amsterdam, v. 78, p. 239-247, 2008.

HAMM, R. Biochemistry of Meat Hydration. **Advances in Food Research**, Amsterdam, v. 10, p. 335-443, 1960.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C. Rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Practice**, London, v. 22, p. 475-476, 1973.

IKEDA, I.; ISMASATO, Y.; SASAKI, E. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. **Biochemical and Biophysical Acta**, Amsterdam, v. 1127, p. 142-146, 1992.

JIA, N.; KONG, B.; LIU, Q.; DIAO, X.; XIA, X. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 91, p. 533-539, 2012.

JOHNSON, M. Molecular mechanisms of β 2-adrenergic receptor function, response, and regulation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Amsterdam, p. 117, p. 18-24, 2006.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K.J.K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, Amsterdam, v. 94, p. 220-227, 2013.

KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA (Japan). MANABE, F.; TANIGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KATAYAMA, M. **Hop oxidation-reaction product, preparing method thereof and use thereof U.S. Patent 20130316023**. Dec 15, 2011. Nov 28, 2013a.

KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA (Japan). TANIGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; MANABE, F.; KATAYAMA, M. **Hop extract oxidation-reaction product, preparing method thereof and use thereof. U.S. Patent 20130316068**. Dez 15, 2011. Nov 28, 2013b.

KUTZLER, L.W.; HOLMER, S.F.; BOLER, D.D.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; PARKS, C.W.; MCKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Comparison of varying doses and durations of ractopamine hydrochloride on late-finishing pig carcass characteristics and meat quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 2176-2188, 2011.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Amsterdam, v. 46, p. 244-282, 2007.

LAHUCKY, R.; NUERNBERG, K.; KOVAC, L.; BUCKO, O.; NUERNBERG, G. Assessment of the antioxidant potential of selected plant extracts - *in vitro* and *in vivo* experiments on pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 85, p. 779-784, 2010.

LANARI, M.C.; SCHAEFER, D.M.; SCHELLER, K.K. Dietary vitamin E supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Amsterdam, v. 41, p. 237-250, 1995.

LEE, M.; CHOI, J.; CHOI, Y.; HANA, D.; KIMA, H.; SHIMA, S.; CHUNG, H.; KIMA, C. The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. **Meat Science**, Amsterdam, v. 84, p. 498-504, 2010.

LENTH, R.V. Statistical power calculations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 24-29, 2007.

LOPEZ-BOTE, C.J.; GRAY, J.I.; GOMAA, E.A.; FLEGAL, C.J. Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. **British Poultry Science**, Cambridge, v. 39, p. 235-240, 1998.

LUNA, A.; LA BAQUE, M.C.; ZYGADLO, J.A.; MARIN, R.H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, Oxford, v. 89, p. 366-370, 2010.

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity *In Vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 86, p. 2046-2056, 2006.

MADSEN, H.L.; SØRENSEN, B.; SKIBSTED, L.H.; BERTELSEN, G. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) in dressing stored exposed to light or in darkness. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 63, p. 173-180, 1998.

MILLS, S.E. Implications of feedback regulation of beta-adrenergic signaling. **Journal of Animal Science**, Champaign, p. 80, p. E30-E35, 2002.

MIRANDA, C.L.; STEVENS, J.F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M.L.; BUHLER, D.R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3876-3884, 2000.

MORRISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.A.; GALVIN, K.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Lipid in meat and meat product. **Meat Science**, Amsterdam, v. 49, p. S73-S86, 1998.

PEETERS, E.; DRIESSEN, B.; GEERS, R. Influence of supplemental magnesium, tryptophan, vitamin C, vitamin E, and herbs on stress responses and pork quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1827-1838, 2006.

RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J.F.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chillstorage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, New York, v. 218, p. 521-524, 2004.

RACANICCI, A.M.C.; MENTEN, J.F.M.; ALENCAR, S.M.; BUISSA, R.S.; SKIBSTED, L.H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as dietary additive for broilers: performance and oxidative stability of meat. **European Food Research and Technology**, New York, v. 232, p. 655-661, 2011.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements**. 3rd ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.

ROSSI, R.; PASTORELLI, G.; CANNATA, S.; TAVANIELLO, S.; MAIORANO, G.; CORINO, C. Effect of long term dietary supplementation with plant extract on carcass characteristics meat quality and oxidative stability in pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 95, p. 542-548, 2013.

RYU, Y.C.; KIM, B.C. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig *Longissimus dorsi* muscle. **Meat Science**, Amsterdam, v. 71, p. 351-357, 2005.

SARKER, M.S.K.; YIM, K.J.; KO, S.Y.; UUGANBAYAR, D.; KIM, G.M.; BAE, I.H.; OH, J.I.; YEE, S.T.; YANG, C.J. Green tea level on growth performance and meat quality in finishing pigs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, p. 10-14, 2010.

SASAKI, K.; MITSUMOTO, M.; KAWABATA, K. Relationship between lipid peroxidation and fat content in Japanese black beef *Longissimus muscle* during storage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 59, p. 407-410, 2001.

SCHINCKEL, A.P.; LI, N.; RICHERT, B.T.; PRECKEL, P.V.; EINSTEIN, M.E. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 1106-1119, 2003.

SHAHIDI, F.; PEGG, R.B. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. **Journal of Food Lipids**, Hoboken, v. 1, p. 177-186, 1994.

SHIMURA, M.; HASUMI, A.; MINATO, T.; HOSONO, M.; MIURA, Y.; MIZUTANI, S.; KONDO, K.; OIKAWA, S.; YOSHIDA, A. Isohumulones modulate blood lipid status through the activation of PPAR α . **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1736, p. 51-60, 2005.

SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Hop (*Humulus lupulus* L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 109, p. 162-172, 2013.

VAN HOYWEGHEN, L.; BIENDL, M.; HEYERICK, A. Radical scavenging capacity of hop-derived products. **BrewingScience**, v. 63, p. 1-5, 2010.

VERBEKE, W.; VAN OECKEL, M.J.; WARNANTS, N.; VIAENE, J.; BOUCQUÉ, C.V. Consumer perceptions, facts and possibilities to improve acceptability of health and sensory characteristics of pork. **Meat Science**, Amsterdam, v. 53, p. 77-99, 1999.

YAJIMA, H.; IKESHIMA, E.; SHIRAKI, M.; KANAYA, T.; FUJIWARA, D.; ODAI, H.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; OIKAWA, S.; KONDO, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor {alpha} and {gamma} and reduce insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, p. 33456-33462, 2004.

YAMAGUCHI, N.; SATOH-YAMAGUCHI, K.; ONO, M. *In Vitro* Evaluation of Antibacterial, Anticollagenase, and Antioxidant Activities of Hop Components (*Humulus lupulus*) Addressing Acne vulgaris. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 16, p. 369-376, 2009.

YI, G.; HAUG, A.; NYQUIST, N.F.; EGELANDSDAL, B. Hydroperoxide formation in different lean meats. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 141, p. 2656-2665, 2013.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão de β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) até 360 mg/kg em dietas melhora a taxa de crescimento de leitões em fase de creche, aparentemente por afetar a eficiência de utilização da dieta, equivalendo-se aos resultados zootécnicos obtidos com o uso de antimicrobiano (colistina) melhorador do desempenho. Além disso, os β -ácidos do lúpulo demonstraram reduzir o conteúdo de gordura, aumentar o conteúdo de proteína e prevenir a peroxidação lipídica no músculo *Longissimus*. Desta forma, os β -ácidos do lúpulo são promissores aditivos naturais de dietas de suínos, especialmente por seu efeito melhorador do desempenho e da deposição de carne magra na carcaça. Entretanto, são necessários estudos no sentido de aumentar a compreensão do mecanismo de ação dos β -ácidos do lúpulo, principalmente com foco em uma possível atividade anti-inflamatória e efeito sobre o metabolismo lipídico, além de estabelecer uma forma prática de sua suplementação na dieta. Alguns cuidados devem ser tomados quanto à estabilidade dos β -ácidos do lúpulo nas dietas de suínos e quanto ao possível impacto do seu sabor amargo sobre o consumo de ração dos animais. Desta forma, o desenvolvimento de tecnologias de microencapsulação se faz necessário para prevenir a oxidação dos princípios ativos e para amenizar o suas características sensoriais acentuadas.

ANEXO

ANEXO A - Parecer da “Comissão de Ética no Uso de Animais”

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO N. 2012-10

PARECER

O projeto “Utilização de beta-ácidos do Lúpulo (*Humulus lupulus*) em dietas de leitões recém-desmamados”, foi examinado pela CEUA desta Escola em reunião de 13 de agosto 2012.

Com base no protocolo experimental apresentado, a CEUA entende que os procedimentos serão realizados de forma a não ferir os princípios éticos na experimentação com animais

Piracicaba, 17 de agosto de 2012

Prof. José Fernando Machado Menten
Coordenador da CEUA