

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

***NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO EM DIETAS DE LEITÕES  
DESMAMADOS***

LUAN SOUSA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Zootecnia como parte das  
exigências para obtenção do Título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Fevereiro – 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

***NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO EM DIETAS DE LEITÕES  
DESMAMADOS***

LUAN SOUSA DOS SANTOS

Zootecnista

Orientador: Prof. Ass. Dr. Dirlei Antonio Berto

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Ribeiro Caldara

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Fevereiro – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Santos, Luan Sousa, 1990-  
S237n Nucleotídeos e ácido glutâmico em dietas de leitões desmamados / Luan Sousa dos Santos. - Botucatu : [s.n.], 2015  
ix, 44 f.: grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015  
Orientador: Dirlei Antonio Berto  
Co-orientador: Fabiana Ribeiro Caldara  
Inclui bibliografia

1. Nucleotídeos. 2. Ácido glutâmico. 3. Leitão (Suíno) - Desmame precoce. I. Berto, Dirlei Antonio. II. Caldara, Fabiana Ribeiro. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

***Dedico***

*Aos meus pais, Arlino (in memoriam) e Edna pelo exemplo de força, dedicação e trabalho.*

*E a toda minha família por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas.*

***Ofereço***

*A minha co-orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabiana Ribeiro Caldara, responsável pela minha preparação profissional durante toda a graduação.*

*Ao Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto pelos ensinamentos, preocupações, paciência e amizade durante o mestrado.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao amor incondicional dos meus pais Arlino (in memoriam) e Edna, das minhas irmãs Flavia e Francielen, e da minha sobrinha Lavínnia.*

*Aos meus familiares por todos os momentos de união, em especial para minha avó Neusa por sempre acreditar no meu futuro e meu primo Bruno por todo apoio e amizade.*

*Aos meus amigos de graduação Bruno Pacito, Camila Magalhães, Marlon Amadori, Mayara Santana e Sueko Tanaka, sempre presentes durante todos os momentos,*

*A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabiana Ribeiro Caldara por toda dedicação disposta durante meu crescimento profissional.*

*A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ibiara Correia de Lima Almeida Paz e Prof. Dr. Rodrigo Garófallo Garcia pela confiança e amizade durante toda minha trajetória.*

*Ao Prof. Dr. Alessandro Borges Amorim pela amizade e disposição durante o planejamento do trabalho.*

*A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Boaro e a Bruna Boaro desde a minha chegada em Botucatu pelos momentos de alegria e disposição.*

*A Dr<sup>ª</sup> Juliana Célia Denadai, Prof. Dr. Carlos Ducatti, Evandro Tadeu, Cibele Kruliski, Marco, Adrielle, Mariana Sasso, Allan Troni, Ana Stradiotti, Mariana Maruno, Nathália Causso, Everton Muro, Jessica Russo e a todos os amigos do Centro de Isótopos estáveis da Unesp de Botucatu pelas sugestões e colaborações durante o planejamento do projeto.*

*A Gabriela de Mello Miassi por toda amizade e colaboração durante a execução do trabalho.*

*Aos amigos Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Marcos Livio Panhoza Tse, Patricia Nardin, Lívea Maria, Jorge Armando e aos funcionários dos setores Adriano, Franco, Sérgio, Nico e Alexandre pela dedicação disposta durante a execução do experimento.*

*Aos funcionários do Departamento de Produção Animal, Cláudio Morales, Renato Agostinho e José Antonio Delanezi pelos momentos de descontração durante um café ou outro.*

*Aos amigos e agregados da república Guilherme Aguiar, Guilherme Pimenta, Cassio, Murilo, Thiago, Lucas Monteiro, Lucas Barros, Eros, Filipe, Paulo Azevedo,*

*Henrique, Jannaylton, Ramilos, Pedro, Rodolfo, Joaz, Hinglidj, Carolina Toledo, Adriana, Joyce, Erikelly Santana, Denise Tsuzukibashi, Verena, Monica Megumi, Tatiane Souza, Amanda da Lapa, Natani e Vanessa Longhini por participarem dos meus principais momentos de alegria em Botucatu.*

*Aos amigos de Jaboticabal Allan Troni, Fred Werneck, Wilton, Jaqueline Gobi, Renan Isola, Aline Remus, Dani Perondi e Cintia Fracaroli por todo companheirismo.*

*A Maria de Lourdes Nardin, Profº Drº Dirlei Antonio Berto e os familiares Nardin e Berto pelo exemplo de vida, união e por todos os momentos de carinho e atenção.*

*A FAPESP pela bolsa e financiamento do projeto.*

*Agradeço a todos por terem feito parte da minha vida, MEU MUITO OBRIGADO!*

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO I</b>	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	02
1. Desmame precoce .....	02
2. Nucleotídeos.....	03
2.1. Guanilato e inosinato dissódico (5'-ribonucleotídeos).....	04
3. Glutamato.....	06
4. Isótopos estáveis do carbono e <i>Turnover</i> nos tecidos corporais .....	07
5. Lipídios e lipoproteínas no plasma sanguíneo .....	10
6. Referências Bibliográficas .....	11
<b>CAPÍTULO II</b>	
DESEMPENHO, PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E TURNOVER DO <sup>13</sup> C NA MUCOSA INTESTINAL DE LEITÕES ALIMENTADOS COM NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO .....	19
Resumo.....	19
Abstract .....	20
Introdução .....	21
Materiais e Métodos.....	22
Resultados .....	26
Discussão .....	27
Conclusões .....	31
Referências.....	31
<b>CAPÍTULO III</b>	
IMPLICAÇÕES .....	44

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

#### DESEMPENHO, PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E TURNOVER DO $^{13}\text{C}$ NA MUCOSA INTESTINAL DE LEITÕES ALIMENTADOS COM NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO

Página

<b>Tabela 1.</b> Composição percentual nutricional e valores do $\delta^{13}\text{C}$ (‰) e do pH das rações pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais (Experimentos 1 e 2).....	36
<b>Tabela 2.</b> Efeito de nucleotídeos (NU) e ácido glutâmico (AG) no ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) de leitões nos períodos experimentais (Experimento 1) .....	37
<b>Tabela 3.</b> Efeito de nucleotídeos (NU), ácido glutâmico (AG) e da idade dos leitões nos teores plasmáticos de colesterol total, triglicérides, HDL colesterol e LDL + VLDL colesterol (Experimento 1) .....	38
<b>Tabela 4.</b> Efeito de nucleotídeos e ácido glutâmico sobre os valores de meia-vida do $^{13}\text{C}$ ( <i>turnover</i> 50%) na mucosa do duodeno e jejuno de leitões desmamados (Experimento 2) .....	39
<b>Tabela 5.</b> Efeito da categoria de peso dos leitões sobre os valores de meia-vida do $^{13}\text{C}$ ( <i>turnover</i> 50%) na mucosa do duodeno e jejuno de leitões desmamados (Experimento 2) .....	40

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

#### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Página

**Figura 1.** Fórmula estrutural do inosina-5' monofosfato dissódico e guanosina-5'-monofosfato dissódico (FAO, 2012)..... 05

### CAPÍTULO II

#### DESEMPENHO, PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E TURNOVER DO $^{13}\text{C}$ NA MUCOSA INTESTINAL DE LEITÕES ALIMENTADOS COM NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO

Página

**Figura 2.** Representação das equações de enriquecimento isotópico para cada um dos tratamentos durante o período experimental e valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno (Experimento 2) ..... 41

**Figura 3.** Representação das equações de enriquecimento isotópico para cada um dos tratamentos durante o período experimental e valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do jejuno (Experimento 2) ..... 42

## **CAPÍTULO I**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A carne suína é a mais consumida mundialmente e sua produção têm crescido anualmente, atingindo em 2013 o volume de 109,45 milhões de toneladas (USDA-FAS, 2014). Um dos fatores que tem contribuído para esse aumento da produção é a melhora da eficiência reprodutiva das matrizes, especialmente graças ao aumento no tamanho médio das leitegadas e a redução do período de amamentação. Os dados da ABIPECS (2013) comprovam a melhora expressiva da produtividade na suinocultura, pois o crescimento do plantel brasileiro nos últimos 35 anos foi de apenas 4%, porém a produção de carne suína aumentou 283% refletidos pelos avanços da genética, tecnologia e manejo empregados.

Para a redução do período de amamentação, nas granjas tecnificadas o desmame dos leitões normalmente é realizado com aproximadamente 21 dias de idade. Os animais passam a receber dieta sólida, dificultando a adaptação à fase pós-desmame. Nessa fase os leitões possuem baixa capacidade de ingestão e de digestão, aumentando a incidência de diarreia e, conseqüentemente, o uso de aditivos nas rações, como ácido glutâmico e nucleotídeos.

### 1. Desmame precoce

Os suínos são submetidos a uma série de práticas estressantes no desmame, tais como, separação brusca da porca, transporte, mudança nas condições de alojamento, alterações na forma física e na composição da dieta, reagrupamento com animais provenientes de outras leitegadas, aumento da exposição a patógenos e antígenos alimentares, resultando em alterações intestinais, imunológicas e comportamentais.

Alguns autores demonstraram que em leitões desmamados com 21 dias de idade, a altura média das vilosidades pode sofrer decréscimo de 25 a 35% nas primeiras 24 horas, continuando até cerca de cinco dias pós-desmame, quando os vilos apresentaram a metade da altura inicial (HAMPSON et al., 1986).

Após a desmama, também há redução na atividade das enzimas digestivas pelas bordas em escova (PLUSKE et al., 1997). Lalles et al. (2004) relataram menor atividade da lactase e aminopeptidases de dois a quinze dias pós-desmama em dietas comuns para leitões, enquanto a maltase reduziu nos dois primeiros dias e aumentou depois de oito a

quinze dias pós-desmama. A fosfatase alcalina, que desempenha importante papel na desintoxicação de endotoxinas também tem significativa redução em leitões desmamados precocemente (LACKEYRAM et al., 2010).

Alterações no metabolismo de aminoácidos também são consequências do desmame de leitões (MONTAGNE et al., 2007), podendo afetar a síntese proteica e, subsequentemente, a deposição de tecido muscular. Além disso, em resposta a ativação do sistema imunológico dos suínos, em função do desmame, ocorre redução do consumo de alimento e do crescimento, piora da eficiência alimentar e menor deposição de tecido magro (WILLIAMS et al., 1997).

Os leitões, portanto, precisam adaptar-se a todos esses fatores de estresse rapidamente, a fim de serem produtivos e eficientes (CAMPBELL et al., 2013).

## 2. Nucleotídeos

Os nucleotídeos são moléculas compostas por ácido fosfórico, um açúcar (em geral uma pentose: ribose ou 2'-desoxiribose) e de uma base púrica ou pirimídica. São bases púricas a adenina (6-aminopurina), a guanina (2-amino-6-oxipurina), a hipoxantina (6-oxipurina) e a xantina (2,6-dioxipurina), e as bases pirimídicas são a citosina (2-oxi-4-aminopirimidina), a uracila (2,4-dioxipirimidina), a timina (2,4-dioxi-5-metilpirimidina) e o ácido orótico (2,4-dioxi-6-carboxipirimidina), (NELSON e COX, 2011).

Os organismos vivos dentre eles humanos, podem sintetizar nucleotídeos e nucleosídeos (molécula de nucleotídeo sem o grupo fosfato) exigidos para o crescimento, entretanto, alguns tecidos como a mucosa intestinal, o cérebro e as células hematopoiéticas tem capacidade limitada para a síntese *de novo* e dependem da via *de salvamento* (YAMAMOTO et al., 1997) em função de suas elevadas taxas metabólicas.

Os nucleotídeos dietéticos, portanto, são importantes na disponibilização de bases nitrogenadas e nucleosídeos que podem ser utilizados imediatamente por meio da via *de salvamento*. Em células de rápido crescimento há limitada capacidade de produção de purinas e pirimidinas pela síntese *de novo*, e a suplementação exógena torna-se fundamental para manter o *pool* de nucleotídeos (UAUY et al., 1994).

Os nucleotídeos provenientes da dieta são necessários para o desenvolvimento de tecidos com rápido *turnover* como a mucosa intestinal (HOLEN e JONSSON, 2004),

o que é relevante para leitões, pois o comprometimento da integridade das vilosidades do intestino delgado que ocorre após o desmame reduz a área de absorção e a produção enzimática (RIOPÉREZ et al., 1991), podendo comprometer o aproveitamento do alimento resultando em queda no desempenho. Para isso algumas fontes de nucleotídeos como extratos de leveduras tem sido estudadas em dietas de leitões.

Alimentos ricos em proteínas como carnes e frutos do mar são as principais fontes de nucleotídeos (BARNES, 1994). Entretanto, as leveduras também apresentam grande concentração (TIBBETTS, 2002). Porém, Sauer et al. (2012) destacaram a limitação do conhecimento das quantidades de nucleotídeos em ingredientes utilizados na alimentação animal, devido a baixa execução de análises para sua quantificação.

Os nucleotídeos também atuam modificando a microbiota intestinal, favorecendo o desenvolvimento de bactérias benéficas (UAUY et al., 1994). Maribo (2003) utilizou extrato de levedura como fonte de nucleotídeos para leitões desmamados infectados com *Escherichia coli* e verificou redução da diarreia e melhora do desempenho zootécnico, comparado com animais que receberam a dieta controle.

Ao usar extrato de levedura como fonte de nucleotídeos, Calson et al. (2005) observaram melhor desempenho de suínos na fase de creche e atribuíram este resultado à melhora na integridade do trato intestinal, beneficiando a digestão e absorção de nutrientes, contudo, Sauer et al. (2011) destaca o questionamento além das condições *in vivo* e *in vitro* que os nucleotídeos são avaliados, mas também as suas fontes que podem advir da cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, outras culturas de levedura e produtos comerciais. As variações nas fontes de nucleotídeos e dos níveis presentes nos produtos disponíveis atualmente requer uma maior atenção na composição dos mesmos que geralmente não são informadas.

### **2.1- Guanilato e inosinato dissódico (5'-ribonucleotídeos)**

Os 5'-ribonucleotídeos (Figura 1), tem importante papel na indústria alimentícia como intensificador de sabor devido sua característica de apresentar o paladar umami.

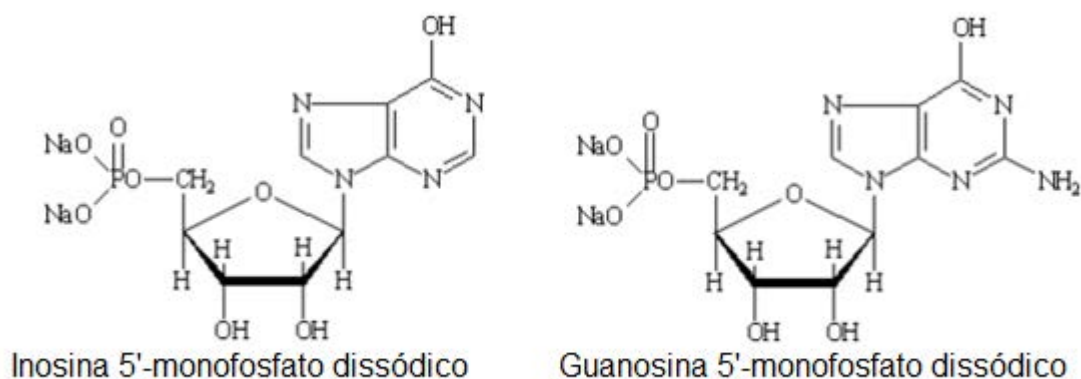


Figura 1. Fórmula estrutural do inosina-5' monofosfato dissódico e guanosina-5' monofosfato dissódico (FAO, 2012).

O inosinato é encontrado apenas em alimentos de origem animal, incluindo sardinhas secas, atum, carnes suína, bovina e de frango em concentrações que normalmente variam de 100-300 mg / 100 g (YAMAGUCHI e NINOMIYA, 2000). O peixe fresco, muitas vezes contém pouco inosinato livre e, portanto, não apresenta sabor umami, porém, algumas horas após a morte, ocorre aumento da concentração de inosinato, intensificando o sabor umami característico. O guanilato ocorre apenas nos alimentos de origem vegetal como alguns cogumelos, tipicamente em concentrações que variam entre 10 e 150 mg / 100 g (YAMAGUCHI, 1967).

Os sensores nervosos da língua são os responsáveis pela percepção do sabor. O nervo corda do tímpano, que inerva a parte anterior da língua, evidencia acentuada percepção de sabor dos aminoácidos (umami, adocicado ou amargo) quando associado a 5'-ribonucleotídeos, como inosina monofosfato em ratos (Damak et al, 2003; Zhao et al., 2003; Kusuhara et al., 2013). A utilização de alguns aminoácidos juntamente com 5'-ribonucleotídeos, tem eficácia na redução dos efeitos sensoriais causados pela diminuição do teor de NaCl com KCl em alimentos processados (CAMPAGNOL et al., 2011; SANTOS et al., 2014).

Em um estudo de Berthold et al. (1995) utilizando nucleotídeos marcados em ratos e aves, destacaram que a hidrólise dos ácidos nucleicos provenientes da dieta acontece no lúmen intestinal por ação de nucleases pancreáticas e fosfatases intestinais, formando-se nucleosídeos que são absorvidos. Contudo, a grande parte das purinas que

os constituem não são incorporados diretamente nos ácidos nucleicos do organismo, pois precisam ser antes degradadas na mucosa intestinal e sintetizadas no fígado.

Alguns processos como a degradação de nucleotídeos, geram amônia livre, portanto, antes de ser retirada dos tecidos para o sangue a amônia livre combina-se com o glutamato, produzindo glutamina pela ação da glutamina-sintetase, para então chegarem ao fígado ou até os rins (NELSON e COX, 2011).

### **3. Glutamato**

O anion carboxilato e os sais do ácido glutâmico são definidos como glutamato. O ácido glutâmico é classificado como um aminoácido não essencial, mas possui papel funcional, especialmente na mucosa intestinal, pois é o maior contribuinte para a produção de energia, atuando como precursor para o biossintese da glutatona e dos aminoácidos prolina e alanina, além de ser substrato no metabolismo intermediário (REEDS et al., 2000; YOUNG e AJAMI, 2000). O glutamato é responsável por 40% da síntese de glutamina (NEWSHOLME et al., 2003), que por sua vez tem participação direta na síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucleicos e açúcares aminados (SMITH, 1990).

Comercialmente as fontes mais comuns de glutamato são o ácido glutâmico e o glutamato monossódico. O ácido glutâmico tem pH aproximado de 3,2 e é o primeiro produto a partir de processos fermentativos e, posteriormente, pode ser neutralizado com bicarbonato de sódio para produção do glutamato monossódico (SANO, 2009). O glutamato livre é encontrado em muitos alimentos como queijo, presunto cru, tomate, ervilhas, milho, aspargo e brócolis, sendo que todos apresentam fontes naturais de substâncias umami ácidas e, conseqüentemente, provocam gosto azedo e são menos solúveis em água (KONDOH e TORII, 2008a). Em tomates maduros a concentração de glutamato é da ordem de 140 mg / 100 g, entretanto, concentrações muito mais elevadas de glutamato livre são encontradas no queijo parmesão (1200 mg / 100 g) destacando-se como um produto de elevado sabor umami (GIACOMETTI, 1979).

O uso do glutamato é amplo, pois desempenha ação de estímulo do sabor como também em funções fisiológicas adicionais dos alimentos, sendo apontado em estudos recentes que os sensores de glutamato e seu sistema de transdução de sinal são encontrados nas células gustativas e também nas células da mucosa do intestino

(BANNAI e TORII, 2013). Algumas fontes de nucleotídeos como a inosina 5'-monofosfato é outra substância umami, que apresenta capacidade de intensificar o sabor dos alimentos sinergicamente ao glutamato (KITAMURA, SATO, et al., 2011).

A sinalização do paladar umami é neural e pode acontecer através de dois tipos de receptores, ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos funcionam como canais iônicos ativados pelo glutamato e regulam respostas rápidas após a ativação, enquanto que os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G (proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares) modulando cascatas de transdução de sinal (CRYAN e DEV, 2008).

Além de papéis gustativos, estudos têm revelado a importância do glutamato para diversas funções fisiológicas, tais como a digestão, absorção, metabolismo e homeostase energética por meio da ativação do cérebro via um sistema sensível ao glutamato no intestino, além disso, no cérebro, o glutamato atua como importante neurotransmissor excitatório e a sua atividade regula a plasticidade sináptica, aprendizagem, memória, atividade motora e desenvolvimento neural, (KONDOH e TORII, 2008a).

As células da mucosa intestinal metabolizam praticamente todo o glutamato após absorção entérica, de modo que a maior parte do glutamato é metabolizado na primeira passagem pelos tecidos do leito esplâncnico (HAEUSSINGER, 1990). Ewtushik et al. (2000) trabalhando com leitões desmamados precocemente verificou menor atrofia das vilosidades no duodeno quando adicionaram 6,51% de glutamato na dieta.

Viarouge et al. (1991) ressalta que a utilização do glutamato eleva o consumo de alimento e conseqüentemente há maior eficiência na termogênese. O tecido adiposo é inervado pelo sistema nervoso simpático, sendo sua ativação melhorada pela presença do glutamato (NIIJIMA et al., 2005). Além de determinar menores níveis plasmáticos de leptina a ação do glutamato suprime a obesidade e deposição de gordura em ratos (KONDOH e TORII, 2008b).

#### **4. Isótopos estáveis do carbono e *Turnover* nos tecidos corporais**

Proteína, lipídios e carboidratos são os principais componentes das dietas de animais e todos eles apresentam papéis importantíssimos para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos, sendo o carbono, hidrogênio e oxigênio elementos

comuns de estruturação. Porém, de forma geral, cada elemento químico pode possuir um ou mais isótopos distintos. Esta nomenclatura é proveniente do grego “*Iso* = mesmo” e “*topos* = lugar”, por ocupar o mesmo lugar na tabela periódica. Estes elementos apresentam natureza distinta quanto ao número de massa, ou seja, são elementos químicos que apresentam o mesmo número de prótons, porém diferente número de nêutrons.

Um exemplo é o  $^{12}\text{C}$ , sua fórmula atômica apresenta seis prótons e seis nêutrons, dessa forma, seu número de massa é 12 (6 prótons + 6 nêutrons), já o  $^{13}\text{C}$  apresenta seis prótons, porém, o número de nêutrons é sete, dessa forma o seu número de massa é 13 (6 prótons + 7 nêutrons). Além disso, são denominados estáveis por não emitirem radiação. A abundância natural para os isótopos estáveis de  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$  é de, aproximadamente 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (KENNEDY e KROUSE, 1990). Estas abundâncias distintas com relação aos isótopos os tornam marcadores naturais.

A mensuração dos isótopos é feita por meio de espectrometria de massas que mensura a concentração dos diferentes isótopos dos elementos e os compara em relação ao padrão internacional. Essa diferença entre razões isotópicas da amostra com relação ao padrão recebe a simbologia ( $\delta$ ). O padrão utilizado para o carbono é o fóssil de *Belemnitella americana*, da formação *PeeDee* (PDB), da Carolina do Sul - EUA (CRISS, 1999).

Na natureza as plantas de diferentes ciclos fotossintéticos discriminam o carbono de forma distinta, o que pode acarretar diferença isotópica da ordem de 14‰ (partes por mil), entre as plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_3$ , que torna possível a utilização destas plantas e seus subprodutos como marcadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados (DUCATTI, 2007). Ao trocar-se em quantidade significativa o carbono da dieta, é possível avaliar o comportamento de incorporação do mesmo nos tecidos do animal em estudo.

Hobson & Clark (1992), confirmaram que as composições isotópicas dos tecidos de animais geralmente assemelham-se às suas dietas, e esses traçadores vêm sendo utilizados com eficácia em vários estudos, como em peixes (ZUANON, 2006), frangos de corte (CARRIJO et al., 2006), galinhas de postura (DENADAI et al., 2006),

codornas de corte (MÓRI et al., 2008) e suínos (CALDARA et al., 2010; AMORIM, 2012).

Pelo valor isotópico dos tecidos corporais do animal refletir o da dieta e essa diferença encontrada tanto na dieta quanto nos tecidos animais pode ser mensurada e designada como fracionamento isotópico. Quando se determina as composições isotópicas dos tecidos em comparação com suas prováveis fontes, têm-se informações quantitativas sobre as contribuições relativas de cada uma dessas fontes de carbono (DENIRO e EPSTEIN, 1978). As contribuições de cada uma das fontes de carbono da dieta nos fornecem uma noção da renovação celular, também denominada *turnover*, em que um novo tecido é formado e ocorre a degradação do tecido velho, ou quando ocorre o crescimento dos tecidos em formação (ZUANON et al. 2006).

Ducatti et al. (2002), fundamentados em resultados da literatura, propuseram um modelo teórico-experimental capaz de exprimir os resultados do enriquecimento relativo de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em função do tempo de alimentação, fornecendo dietas contrastantes em  $\delta^{13}\text{C}$  à animais adultos chegando a equação  $\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt}$ , em que a simbologia adimensional empregada significa  $\delta^{13}\text{C}(t)$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo;  $\delta^{13}\text{C}(f)$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final,  $\delta^{13}\text{C}(i)$  = enriquecimento isotópico do tecido na condição inicial e  $k$  = constante de troca (turnover) em função do tempo.

A meia-vida refere-se ao intervalo de tempo requerido para que o sinal do isótopo estável do tecido do consumidor alcance o valor médio entre a dieta original observada e o que será verificado na nova dieta em equilíbrio. Neste sentido, o conceito da meia-vida ( $T = \ln 2/k$ ) torna-se um parâmetro de ordem prática a ser mensurado (DUCATTI et al. 2002).

Na equação,  $t = (-1/k)\ln(1 - f)$ , proposta por Wolfe e Chinkes (2005), observa-se que é possível encontrar o tempo necessário para determinar a fração ( $f$ ) de átomos trocados (remanescentes) no patamar de equilíbrio alcançado, desde que conheça a constante do turnover  $k$ .

## **5. Lipídios e lipoproteínas no plasma sanguíneo**

Os lipídios tem por característica principal a solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água. Dentre as suas principais funções, destacam-se como fonte e reserva de energia, isolante térmico, além de compor a membrana plasmática das células (fosfolipídeos).

O colesterol e os triglicérides (também conhecidos como triacilglicerol) são os lipídeos plasmáticos mais importantes clinicamente (BROWN e GOLDSTEIN, 1986). O colesterol tem papéis importantes como precursor dos hormônios esteroides e da vitamina D, compõem os ácidos biliares, além de atuarem na sinalização e ativação neural (REPA e MANGELSDORF, 2000). Aproximadamente 80% do colesterol circulante no organismo é derivado de sínteses endógenas e o restante é oriundo da dieta (REGELE, 2009).

A insolubilidade do colesterol e triglicérides exige que sejam transportados em macromoléculas denominadas lipoproteínas. As principais lipoproteínas de transporte são os quilomícrons, VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (lipoproteínas de alta densidade) (REGELE, 2009). Os quilomícrons são compostos oriundos da absorção de colesterol e triglicéride de origem exógena (TOMKIN, 2008). O HDL atua como um importante transportador de colesterol dos tecidos periféricos até o fígado, já as frações LDL e VLDL atuam em direção reversa, transportando colesterol do fígado até os tecidos periféricos (ECKEL, 2011). Essas frações lipoproteicas foram estudadas em humanos (SANCHEZ-POZO et al., 1986), ratos (CARVER, 1994; NISHIZAWA et al., 1996 e SINGH et al., 2011) e peixes (MOHEBBI et al., 2013).

Em ratos adultos, uma dieta deficiente de nucleotídeos, resultou em acúmulo de lipídios no fígado (CARVER, 1994), enquanto dietas enriquecidas com nucleotídeos para ratos em crescimento (NISHIZAWA et al., 1996), crianças recém-nascidas (SANCHEZ-POZO et al., 1986) e em peixes (MOHEBBI et al., 2013) alterou positivamente o metabolismo das lipoproteínas. Enquanto a utilização de glutamato monossódico via oral para ratos, reduziu os níveis de HDL e aumentou os níveis de LDL no sangue (SINGH et al., 2011).

Apesar da dieta ter uma menor contribuição sobre o perfil das lipoproteínas em relação à síntese endógena, pesquisas têm demonstrado modificações na composição das frações lipoproteicas em animais em função da dieta.

Os objetivos da presente pesquisa foi avaliar os efeitos da adição de nucleotídeos púricos (inosinato e guanilato) e de ácido glutâmico nas dietas sobre o desempenho, perfil lipídico plasmático e *turnover* do  $^{13}\text{C}$  na mucosa intestinal em leitões na fase de creche.

Desse modo, o Capítulo II, intitulado “DESEMPENHO, PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E *TURNOVER* DO  $^{13}\text{C}$  NA MUCOSA INTESTINAL DE LEITÕES ALIMENTADOS COM NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO” foi adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico **Livestock Science**.

## 6. Referências Bibliográficas

AMORIM, A.B. **Efeito da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos sobre o turnover do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em tecidos de leitões desmamados**. 2012. 112 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA - ABIPECS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 09/05/2013.

BANNAI, M.; TORII, K. **Detection of dietary glutamate via gut-brain axis**. Digestive Physiology of the pig symposium. p.1974-1981, 2013.

BARNESS, L. Dietary source of nucleotides - from breast milk to weaning. **Journal of Nutrition**, v.124, p.128-130, 1994.

BERTHOLD, H.K. et al. Evidence for incorporation of intact dietary pyrimidine (but not purine) nucleosides into hepatic RNA, **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**. v.92, p.10123-10127, 1995.

BROWN, M. S. e GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v.232, p.34-47, 1986.

CALDARA, F.R. et al. Glutamina e *turnover* do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.2664-2669, 2010.

CALSON, M.S., VEUM, T.L. and TURK, J.R. Effects of yeast extract versus animal plasma in weanling pig diets on growth performance and intestinal morphology. **Journal of Swine Health Production**., v.13, p.204-209, 2005.

CAMPAGNOL, P.C.B. et al. Application of lysine, taurine, disodium inosinate and disodium guanylate in fermented cooked sausages with 50% replacement of NaCl by KCl. **Meat Science**, v.87, p.239–243, 2011.

CAMPBELL, J.M.; CRENSHAW, J.D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, p.19, 2013.

CARRIJO, A.S. et al. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analyses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.37-42, 2006.

CARVER, J. D. **Dietary nucleotides**: cellular immune, intestinal, and hepatic system effects. Symposium: Nucleotides and Nutrition. *Journal of Nutrition*. p. 144-148, 1994.

CRISS, R.E. **Principles of stable isotope distribution**. New York: Oxford University Press., 1999. 254p.

CRYAN, J.F.; DEV, K.K. The glutamatergic system as a potential therapeutic target for the treatment of anxiety disorders. **Handbook of Anxiety and Fear**. Blanchard, Academic Press, Dusseldorf. p.269–301, 2008.

DAMAK, S. et al. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. **Science** v.301, p.850 –853, 2003.

DENADAI, J.C. et al. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.251-256, 2006.

DeNIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p.495-506, 1978.

DUCATTI, C. **Isótopos Estáveis Ambientais**. Botucatu. Universidade Estadual Paulista, 2007. 204p. Apostila.

DUCATTI, C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**. v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

ECKEL, R. H. **Metabolic risk for cardiovascular disease**. American Heart Association National Center, Dallas. 2011.

EWYUSHIK, A. L.; BERTOLO, R. F. P.; BALL, R. O. Intestinal development of early-weaned piglets receiving diets supplemented with selected amino acids or polyamines. **Canadian Journal of Animal Science**. v.80, p.653-662, 2000.

FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. Disodium 5'-Ribonucleotides Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-169.pdf>. Acesso em 17 de out. 2012.

GIACOMETTI, T. Free and bound glutamate in natural products. In: Filer LJ, Garattini S, Kare MR, Reynolds AW, Wurtman RJ, eds. *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology*. New York: Raven Press, p.25–34, 1979.

HAEUSSINGER, D. Nitrogen metabolism in liver, structural and functional organization and physiological relevance. **Biochemical Journal**. v.267, p.281-290, 1990.

HAMPSON, D.J. Alterations of piglet small intestine structure at weaning. **Research in Veterinary Science**, v.40, p.32-40, 1986.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of <sup>13</sup>C in tissues, **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992.

HOLEN, E.; JONSSON, R. Dietary nucleotides and intestinal cell lines: 1. Modulation of growth. **Nutrition Research**. v.24, p.197-207, 2004.

KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v.68, p.960-972, 1990.

KITAMURA, A. et al. Effects of intragastric infusion of inosine monophosphate and L-glutamate on vagal gastric afferent activity and subsequent autonomic reflexes. **Journal of Physiological Sciences**, v.61, p.65-71, 2011.

KONDOH, T.; TORII, K. Brain Activation by Umami Substances via Gustatory and Visceral Signaling Pathways, and Physiological Significance. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.31, p.1827-1832, 2008a.

KONDOH, T.; TORII, K. MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague–Dawley rats. **Physiology & Behavior**. v.95, p.135-144, 2008b.

KUSUHARA, Y. et al. Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. **Journal Physiology**, v.591, p.1967–1985, 2013.

LACKEYRAM, D. et al. Early weaning reduces small intestinal alkaline phosphatase expression in pigs. **Journal of Nutrition**, v.140, p.461-468, 2010.

LALLES, J. et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, v.53, p.301-316, 2004.

MARIBO, H. Weaning pigs without antibiotic growth promoters: strategies to improve health and performance. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, Lexington, **Anais**. Lexington: Nottingham University Press, 2003. p.179-184.

MOHEBBI, A. et al. Effects of dietary nucleotides on the antioxidant status and serum lipids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Nutrition**. v.19, p.506-514, 2013.

MONTAGNE, L. et al. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.97, p.45-57, 2007.

MÓRI, C. et al. Poultry offal meal traceability in meat quail tissues using the technique of stable carbon( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) isotopes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**. v.10, p.45-52, 2008.

NELSON, D.L. e COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry, 5ª edition, W. H. Freeman and Company, New York e Basingstoke. 2011.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.36, p.153-163, 2003.

NIJIMA, A.; TORII, K.; UNEYAMA, H. Role played by vagal chemical sensors in the hepato-portal region and duodeno-intestinal canal: an electrophysiological study. **Chemical Senses**. v.30, p.178-179, 2005.

NISHIZAWA, N.; HARADA, Y.; FUJIMOTO, M. **Effect of dietary nucleotides on cholesterol metabolism in mice**. 70º Annual Meeting of Japan Society for bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry. Tokyo, p.15, 1996.

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

REEDS, P. J. et al. Intestinal glutamate metabolism. **Journal of Nutrition**. v.130, p.978-982, 2000.

REGELE, R. A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nature Reviews Genetic**. v.10, p.109-121, 2009.

REPA, J.J. e MANGELSDORF, D.J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.16, p.459–481, 2000.

RIOPÉREZ, J.; SÁNCHEZ, C.P.; CANTAÑO, M. Estudio histopatológico del ileon de lechones precozmente destetados dependiente del cereal utilizado em su alimentacion. **Archivos de Zootecnia**, v.40, p.261-271, 1991.

SANCHEZ-POZO, A. et al. Effect of dietary nucleotides upon lipoprotein pattern of newborn infants. **Nutrition Research**. v.6, p.53-57, 1986.

SANO, C. History of glutamate production. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.90, p.928-932, 2009.

SANTOS, B.A. et al. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. **Meat Science**, v.96, p.509-513, 2014.

SAUER, N. MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The role of dietary nucleotides in single stomached animals. **Nutrition Research Reviews**, v.24, p.46-59, 2011.

SAUER, N.; BAUER, E.; MOSENTHIN, R. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.90, p. 3126–3134, 2012.

SINGH, K. et al. Alteration upon oral ingestion of monosodium glutamate various lipid and lipoprotein fractions in serum of adult male rat. **Journal of Life Science**. v.3, p.17-21, 2011.

SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, p. 40-44, 1990.

TIBBETTS, G.W. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal protein sources in food animal diets. In: **Annual symposium of nutritional biotechnology in the feed and food industries**. Proceedings, Nottingham, p. 435-443, 2002.

TOMKIN, G.H. The intestine as a regulator of cholesterol homeostasis in diabetes. **Atheroscler**. s.9, p.27–32, 2008.

UAUY, R.; QUAN, R.; GIL, A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. **Journal of Nutrition**. v.124, p.1436-1441, 1994.

USDA - United States Department Of Agriculture, Foreign Agricultural. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov>, Acesso em: 16/10/2014. 2014.

VIAROUGE, C. et al. **Physiology and Behavior**. v.49, p.1013-1018, 1991.

WILLIAMS, N.H.; STAHLY, T.S.; ZIMMERMAN, D.R. Effect of chronic immune system activation on rate, efficiency, and composition of growth and lysine needs of pigs fed from 6 to 27 kg. **Journal of Animal Science**. v.75, p.2463-2471, 1997.

WOLFE, R.R, CHINKES D.L. Measurement of the synthesis of specific proteins. In: Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis. 2. ed. Hoboken: Wiley-Liss, Inc. 2005. pp. 325–360.

YAMAGUCHI, S.; NINOMIYA, K. Umami and food palatability. **Journal of Nutrition**. v.130, p.921–926, 2000.

YAMAGUCHI, S. The synergistic effect of monosodium glutamate and disodium 5'-inosinate. **Journal of Food Science**. v.32 p.473–8, 1967.

YAMAMOTO, S. et al. Role of nucleosides and nucleotides in the immune system, gut reparation after injury, and brain function. **Nutrition**. v.13, p. 372-374, 1997.

YOUNG, V.R.; AJAMI, A.M. Glutamate: An amino acid of particular distinction. **Journal of Nutrition**. v. 130, p. 892-900, 2000.

ZHAO, G.Q. et al. The receptors for mammalian sweet and umami taste. **Cell**. v.115, p.255–266, 2003.

ZUANON, J.A.S. et al. Muscle <sup>13</sup>C change in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.145, p.101-107, 2006.

## **CAPÍTULO II**

**DESEMPENHO, PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E *TURNOVER* DO <sup>13</sup>C NA MUCOSA INTESTINAL DE LEITÕES ALIMENTADOS COM NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDO GLUTÂMICO**

**Resumo:** Os objetivos desta pesquisa foram avaliar os efeitos da utilização de nucleotídeos (NU) e ácido glutâmico (AG) na dieta de leitões sobre o desempenho e perfil de lipídeos plasmáticos (colesterol total - CT, triglicérides - TRI, HDL colesterol e LDL+VLDL colesterol) (experimento I) e *turnover* do <sup>13</sup>C na mucosa do duodeno e jejuno (meia-vida do <sup>13</sup>C) (experimento II). Em ambos os experimentos foi utilizado delineamento experimental de blocos ao acaso, com esquema fatorial 2x2 dos tratamentos, sendo dois níveis de NU (0 e 0,1%) e dois níveis de AG (0 e 1%), com sete repetições e três animais por parcela. O primeiro experimento teve duração de 35 dias e foram utilizados 84 leitões desmamados aos 21 dias de idade e com peso médio inicial de 6,54±0,70kg. No segundo experimento, nos dias 3, 6, 9, 14, 21, 34 e 49 após o desmame, foram abatidos três leitões por tratamento e no dia do desmame (dia zero) foram abatidos três leitões, totalizando 87 animais com peso inicial de 6,28±0,13kg. Não houve interação dos fatores nas variáveis analisadas e nem efeitos de NU e do AG no consumo diário de ração, ganho diário de peso, CT, HDL colesterol, TRI, LDL + VLDL colesterol e no *turnover* do <sup>13</sup>C na mucosa intestinal. O uso de NU na dieta piorou ( $P \leq 0,05$ ) a conversão alimentar no período de 0 a 27 dias, mas esta variável não foi influenciada no período total de experimento (0 a 35 dias). Ocorreu redução ( $P < 0,0001$ ) na concentração plasmática de todas as variáveis estudadas aos 56 dias em relação aos 21 dias de idade e na mucosa do jejuno a meia-vida do <sup>13</sup>C foi maior nos leitões mais leves ( $P \leq 0,05$ ). Conclui-se, portanto, que a adição de NU e AG nas dietas não interferem no desempenho, no perfil lipídico plasmático e no *turnover* do <sup>13</sup>C na mucosa do duodeno e jejuno de leitões recém-desmamados no período total de creche.

**Palavras-chave:** 5'-ribonucleotídeos, glutamato, isótopos estáveis, suínos, umami.

**PERFORMANCE, PLASMA LIPID PROFILE AND TURNOVER OF <sup>13</sup>C IN  
THE INTESTINAL MUCOSA OF PIGLETS FED WITH NUCLEOTIDES AND  
GLUTAMIC ACID**

**Abstract:** The objectives of this research were to evaluate the effects of nucleotides (NU) and glutamic acid (AG) in the diet of pigs on performance and plasma lipid profile (total cholesterol - CT, triglycerides - TRI, HDL cholesterol and LDL + VLDL cholesterol ) (experiment I) and turnover of <sup>13</sup>C in duodenal and jejunum mucosa (<sup>13</sup>C half-life) (experiment II). In both experiments we used experimental design of randomized blocks, with 2x2 factorial treatments, with two levels of NU (0 and 0.1%) and two levels of AG (0 and 1%), each treatment had seven replicated and three pigs per pen. The first experiment lasted 35 days and were used 84 piglets weaned at 21 days of age and average initial weight of  $6.54 \pm 0,70$ kg. In the second experiment, on days 3, 6, 9, 14, 21, 34 and 49 after weaning, were slaughtered three pigs per treatment and the day of weaning (day zero) were slaughtered three piglets, totaling 87 animals with initial weight  $6.28 \pm 0,13$ kg. There was no interaction of factors in the analyzed variables and not effects of NU and AG in daily feed intake, daily weight gain, CT, HDL cholesterol, TRI, LDL + VLDL cholesterol and <sup>13</sup>C turnover in the intestinal mucosa. The use of NU in the diet has worsened ( $p \leq 0.05$ ) feed conversion in the period 0-27 days, but this variable was not affected in the total period (0-35 days). We observed a decrease ( $P < 0.0001$ ) in plasma concentration of all variables after 56 days compared to 21 days of age and in the jejunal mucosa the <sup>13</sup>C half-life was higher in lighter piglets ( $p \leq 0.05$ ). It can be concluded therefore that the addition of AG and NU in the diets did not affect performance, the plasma lipid profile and <sup>13</sup>C turnover in the duodenum and jejunum mucosa of weaned piglets in total nursery period.

**Palavras-chave:** 5'-ribonucleotide, glutamate, stable isotope, swines, umami.

## **Introdução**

O estresse de ordem nutricional imposto aos leitões no desmame está relacionado à mudança na forma física da dieta que, normalmente, passa de líquida para sólida. Além disso, a substituição nas dietas pré-iniciais de grande parte da lactose, da proteína e da gordura do leite por fontes proteicas e energéticas de origem vegetal resulta em baixa ingestão de alimento e alterações na mucosa do intestino delgado, com diminuição na capacidade de digestão (Pluske et al., 1997) e de absorção de nutrientes, comprometendo a taxa de crescimento (Dong et al., 2007) e predispondo a maior risco de problemas entéricos.

Devido às limitações digestivas em leitões recém-desmamados, aditivos melhoradores de desempenho como o ácido glutâmico e os nucleotídeos tem sido estudados. O ácido glutâmico (AG) é um aminoácido não essencial multifuncional que age como substrato essencial no metabolismo intermediário, sendo a sua forma livre muito importante nos tecidos e órgãos como cérebro, rins, fígado além de exercer funções importantes no sistema imune, no sistema nervoso central (Newsholme et al., 2003) e intestino (Burrin e Stoll, 2009). Na mucosa intestinal o AG é usado como fonte de energia e substrato para a síntese de outros aminoácidos e de glutathione (Reeds et al., 2000; Young e Ajami, 2000). Os nucleotídeos dietéticos são importantes na disponibilização de bases nitrogenadas e nucleosídeos para tecidos e órgãos com síntese deficiente dos mesmos. A adição de nucleotídeos na dieta beneficia a taxa mitótica do intestino de leitões desmamados, favorecendo o desenvolvimento intestinal (Domeneghini et al., 2004), além de atuar como estimulante do sistema imune (Rossi et al., 2007).

O anion carboxilato e os sais do ácido glutâmico são definidos como glutamato (GLU). Tanto o GLU como os nucleotídeos (NU) apresentam paladar umami, que tem importância como sinalizador de ingestão de proteínas (Kondoh e Torii, 2008). No entanto, a combinação de glutamato monossódico (GM), com 5'-ribonucleotido (5'-inosinato e 5'-guanilato) aumenta o paladar umami mais do que a adição desses produtos isoladamente, evidenciando ação sinérgica (Yamaguchi, 1967; Yamaguchi e Ninomiya, 2000).

Os NU da dieta podem exercer ação melhoradora de desempenho em suínos (Calson et al., 2005) e alterar o perfil lipídico plasmático em crianças recém-nascidas (Sanchez-Pozo et al., 1986) e em ratos (Nishizawa et al., 1996), enquanto a adição de GM na dieta tem promovido melhora na eficiência alimentar de leitões (Rezaei et al., 2013). A definição das fontes de NU recomendadas na dieta de leitões não está bem definido, em função da variação na composição dos produtos disponíveis quanto aos níveis e tipos de NU presentes. Já as pesquisas com AG como melhorador de desempenho ou possível interferente na fração lipídica plasmática de leitões são limitadas.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da adição de NU e AG na dieta de leitões recém-desmamados sobre os parâmetros de desempenho, perfil lipídico plasmático e a técnica dos isótopos estáveis no *turnover* do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno e jejuno em animais com diferentes taxas de crescimento.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no galpão experimental de suínos na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta instituição, protocolo nº 151/2013-CEUA.

### *Instalações e dietas experimentais*

Um total de 171 leitões desmamados com idade média de 21 dias, de linha comercial, machos castrados e fêmeas, foram alojados em sala de creche, construída em alvenaria, em baias metálicas suspensas com piso parcialmente ripado e dimensões de 1,0 x 1,75 m, equipadas com comedouros e bebedouros tipo chupeta. O controle da temperatura interna da sala de creche foi realizado com a regulagem das cortinas laterais e com o manejo das campânulas de aquecimento instaladas em cada uma das baias.

A principal fonte energética das dietas experimentais foi a quirera de arroz, matéria-prima oriunda de planta do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$ , para que apresentassem sinais isotópicos de  $^{13}\text{C}$  distintos das dietas fornecidas aos leitões lactentes e às matrizes que, a partir da cobertura até o desmame, receberam rações cuja fonte energética

principal foi o milho, que é uma planta de ciclo fotossintético C<sub>4</sub>. O procedimento de alterar a razão isotópica das dietas fornecidas aos leitões após o desmame em relação àquelas fornecidas as matrizes em gestação e lactação e aos leitões lactentes, foi necessária para possibilitar a avaliação da velocidade de alteração na razão isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do carbono no duodeno e no jejuno dos leitões depois do desmame.

Os leitões foram alimentados à vontade e submetidos ao programa de alimentação por fases, de modo a atender as exigências nutricionais mínimas, de acordo com Rostagno et al. (2011), considerando as seguintes fases: pré-inicial I (21 aos 36 dias de idade), pré-inicial II (36 aos 48 dias de idade) e inicial (48 aos 56 dias de idade).

Os tratamentos avaliados foram combinados em arranjo fatorial 2 x 2, sendo dois níveis de nucleotídeos (NU): 0,0 e 0,1% e dois níveis de ácido glutâmico (AG): 0,0 e 1,0% nas dietas. A fonte de nucleotídeos utilizada era composta de guanilato e inosinato dissódico com 98% de pureza. As composições percentuais, nutricionais e os valores do pH e do  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais são apresentadas na Tabela 1.

As dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais foram amostradas e submetidas à análise de pH utilizando 20 g de ração, na qual foi adicionado 30 mL de água destilada deionizada, que posteriormente foi agitada até obter-se uma mistura homogênea. Duas medidas foram realizadas por meio de peagômetro e considerou-se a média do pH para cada amostra.

#### *Experimento I: desempenho e perfil lipídico plasmático*

Foram utilizados 84 leitões machos castrados e fêmeas desmamados, com peso inicial de 6,54±0,70kg, alimentados à vontade. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro tratamentos, sete repetições e três leitões por unidade experimental. Os critérios para formação dos blocos foram peso e o sexo dos leitões.

Os resultados de desempenho (consumo diário de ração, ganho diário de peso e conversão alimentar) foram avaliados nos períodos dos 21 aos 36 dias, dos 21 aos 48 dias e dos 21 aos 56 dias de idade dos leitões, sendo que no início e no final do experimento durante o período da manhã foram colhidas amostras de sangue para análises dos níveis plasmáticos de colesterol total, HDL colesterol e triglicérides pelo método enzimático colorimétrico de ponto final utilizando “kit” comercial.

As variáveis de desempenho e do perfil lipídico plasmático foram submetidas à análise de variância com dois fatores (NU e AG), atribuindo significância quando ( $P \leq 0,05$ ), por meio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Os valores iniciais de todos os parâmetros lipoproteicos serviram para ajuste final das médias por covariável. A fração LDL + VLDL colesterol foi determinada por diferença entre o colesterol total e o conteúdo em HDL colesterol.

*Experimento II: turnover do  $^{13}C$  na mucosa do duodeno e jejuno*

Um total de 87 leitões machos castrados e fêmeas desmamados, com peso inicial de  $6,28 \pm 0,13$  kg foram distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro tratamentos, três repetições e um animal por unidade experimental. O critério para formação dos blocos foi a categoria de peso dos leitões (pesados, médios e leves).

Nos dias 3, 6, 9, 14, 21, 35 e 49 após o desmame, foram sacrificados, após eletronarcese, três leitões por tratamento, sendo um de cada categoria de peso. No dia do desmame (dia zero) foram abatidos três leitões, com o objetivo de avaliar a composição isotópica inicial da mucosa do duodeno e do jejuno.

Após o abate, o ventre dos animais foi aberto e retirado segmentos de aproximadamente 30 cm de comprimento do duodeno e do jejuno, que foram lavados com solução fisiológica e abertos pela borda mesentérica, sendo lavados novamente e, em seguida, coletadas amostras da mucosa por meio de raspagem com lamina de vidro. Após as coletas as amostras foram acondicionadas em microtubos de plástico, identificadas e imediatamente congeladas ( $-18^{\circ}C$ ) até a sua preparação para as análises isotópicas.

O processamento das amostras para a realização das análises isotópicas envolveu o congelamento a  $-196^{\circ}C$  em nitrogênio líquido e liofilização. As amostras das rações foram moídas em moinhos criogênico à  $-196^{\circ}C$  (Spex-modelo 6750 freezer/mil) por oito minutos em alta frequência para obtenção de material homogêneo com aspecto microscópico.

Para determinação da composição isotópica das amostras foi utilizado o espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha), do centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto

de Biociência da UNESP, Campus Botucatu. Os resultados foram expressos em notação  $\delta^{13}\text{C}$ , em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,20‰ e calculado pela equação:

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3, \text{ em que:}$$

$\delta^{13}\text{C}$  e o enriquecimento da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra em relação ao padrão. Adimensional.

R = razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra e do padrão. Adimensional.

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nas amostras, foi empregada a função exponencial do tempo, de acordo com Ducatti et al. (2002) expressa pela equação:

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)] e^{-kt}$$

A simbologia empregada significa:

$\delta^{13}\text{C}(t)$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t).

Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(f)$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(i)$  = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo<sup>-1</sup>

t = tempo (em dias) desde a substituição da ração.

A meia-vida do carbono na mucosa intestinal dos leitões nos tratamentos, em t = T e o cálculo da porcentagem de incorporação do carbono na mucosa intestinal foram calculadas pelas equações:

$$T = \ln 2/k$$

$$\% \text{ de Carbono substituído} = 1 - e^{-kt}$$

Em que:

T = meia-vida, unidade: tempo (dias)

ln = logaritmo neperiano

k = constante de *turnover*, unidade: dia<sup>-1</sup>, fornecendo uma ideia de “velocidade” no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos e digesta (Ducatti et al., 2002).

t = tempo do ultimo ponto analisado (dias)

Os dados isotópicos da mucosa do duodeno e jejuno foram analisadas pelo método de equações exponenciais de primeira ordem do software Minitab® 16, considerando as categorias de peso dos leitões (pesados, médios e leves), gerando curvas de enriquecimento isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ , que possibilitou calcular os valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  para cada uma destas categorias e para cada um dos tratamentos avaliados. Os resultados de meia-vida foram então submetidos à análise de variância com dois fatores (NU e AG), atribuindo significância quando ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

## **Resultados**

### *Desempenho*

Os resultados de desempenho são apresentados na Tabela 2. Não houve interação ( $P > 0,05$ ) dos fatores nas variáveis avaliadas e nem de NU e do AG no consumo diário de ração (CDR) e ganho diário de peso (GDP). O uso de NU na dieta piorou ( $P = 0,05$ ) a conversão alimentar (CA) no período de 0 a 27 dias, mas esta variável não foi influenciada no período total de experimento (0 a 35 dias).

### *Perfil lipídico plasmático*

Os resultados de perfil lipídico plasmático são apresentados na Tabela 3. Não houve interação e nem efeito dos fatores ( $P > 0,05$ ) sobre as variáveis de colesterol total (CT), HDL colesterol, triglicérides (TRI) e LDL + VLDL colesterol, porém houve diminuição ( $P < 0,0001$ ) na concentração plasmática dessas variáveis aos 56 dias de idade dos leitões, comparada à idade de 21 dias.

### *Turnover do $^{13}\text{C}$ na mucosa do duodeno e jejuno*

Na Tabela 1, são apresentados os valores do  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) das dietas pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais e as Figuras 2 e 3 apresentam as curvas exponenciais de enriquecimento isotópico do  $^{13}\text{C}$  na mucosa intestinal dos leitões nos diferentes tratamentos. Aos 49 dias de experimento as porcentagens de troca do  $\delta^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno e do jejuno foram, respectivamente, de 98 e 99, 99 e 99, 99 e 99, 99 e 98% para o tratamento controle, tratamento com 0,1% de NU, tratamento com 1% de AG e tratamento com 1% de AG + 0,1% de NU.

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para os fatores isolados e nem interações dos mesmos para os valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  (*turnover* 50%) da mucosa do duodeno e jejuno (Tabela 4).

A comparação dos valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  (*turnover* 50%) entre animais das diferentes categorias de peso corporal mostrou que para a mucosa do jejuno os leitões mais leves apresentaram valor maior ( $P<0,05$ ) em relação às demais categorias de peso, porém, essa diferença não foi detectada na mucosa do duodeno (Tabela 5).

### **Discussão**

Os NU provenientes da dieta são necessários para o desenvolvimento de tecidos com rápido *turnover* como a mucosa intestinal (Holen e Jonsson, 2004) o que é importante para leitões, pois o comprometimento da integridade das vilosidades do intestino delgado que ocorre após o desmame precoce reduz a área de absorção e a produção enzimática (Hedeman et al., 2003). Além disso, exercem ação moduladora na microbiota intestinal (Uauy et al., 1994), são importantes para a resposta imune e reduzem o estresse oxidativo (Sauer et al., 2012). Porém, em situações de menores desafios ambientais e nutricionais, como ocorreu no presente experimento onde os leitões foram mantidos em instalações com baixa taxa de lotação e que foram previamente submetidas a limpeza, desinfecção e vazio sanitário, e foram alimentados com dietas complexas contendo agentes antimicrobianos como óxido de zinco e sulfato de cobre, respostas favoráveis nas variáveis avaliadas são mais difíceis de serem evidenciadas.

O suprimento de bases aminadas exógenas acelera a síntese de DNA nas células, podendo auxiliar o crescimento e a recuperação de tecidos, principalmente em condições de estresse fisiológico (Carver e Walker, 1995) pelo fato das rações comumente fornecidas aos leitões não apresentarem concentrações de NU suficientes para atender as exigências (Stein e Kil, 2006). Os alimentos utilizados em dietas pós-desmame, embora possam fornecer NU específicos como a citidina-5'-monofosfato (5'CMP), normalmente são deficientes em adenosina-5'-monofosfato (5'AMP), guanosina-5'-monofosfato (5'GMP), inosina-5'-monofosfato (5'IMP) e uridina-5'-monofosfato (5'UMP) (Mateo, 2005), exigindo do organismo a necessidade de maior produção de nucleotídeos via síntese *de novo*.

A utilização de NU nas dietas não alterou o GDP e o CDR nos períodos estudados, porém determinou piora na CA de 0,03 pontos nos primeiros 27 dias do período experimental, diferente de Sauer et al. (2012), que não encontraram diferença na eficiência alimentar quando adicionaram NU na dieta de leitões na fase de 0 a 20 dias pós-desmame. Entretanto, o efeito negativo de NU sobre a CA não ocorreu quando foi considerado o período total do experimento (0 aos 35 dias). Pesquisas têm demonstrado que níveis crescentes (até 0,1%) de 5'IMP nos primeiros sete dias pós-desmama, melhora o GDP e o CDR (Weaver e Kim, 2014). Entretanto, dos sete aos 14 dias não foram verificadas diferenças em nenhuma das variáveis de desempenho, além disso, a suplementação de 0,05% de 5'IMP nas dietas favoreceu a resposta imune de leitões, quando comparado com níveis de 0,02 e 0,10% (Weaver e Kim, 2014). Um estudo avaliando uma mistura de NU nas dietas em dosagens de até 0,01% para leitões recém-desmamados demonstrou que mesmo a maior dose não foi suficiente para alterar positivamente as respostas de desempenho (Lee et al., 2007).

Os nucleotídeos afetam positivamente o metabolismo de lipoproteínas e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa em crianças (Schlimme et al., 2000). Porém no presente estudo, a resposta do uso de NU no perfil lipídico plasmático dos leitões foi ausente. Esses resultados contrariam pesquisas em que houve aumento nos níveis plasmáticos de HDL colesterol e redução nos níveis de LDL + VLDL colesterol em ratos em crescimento (Nishizawa et al., 1996) e crianças recém-nascidas (Sanchez-Pozo et al., 1986) quando foi adicionado NU nas dietas, até 1,49 mg/kcal de energia bruta. As respostas no perfil lipídico sérico de peixes somente foram observadas a partir de 0,15% de suplementação de NU na dieta (Mohebbi et al., 2013), o que sugere que as respostas no perfil lipídico sanguíneo podem variar com a espécie animal, concentração e tipo de NU avaliado.

O AG possui teor de energia metabolizável verdadeira de 3484 kcal/kg (Rostagno et al., 2011) e o glutamato monossódico (GM) pode alterar a disponibilidade de glicose, lipídeos e lipoproteínas no sangue por meio de hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperlipoproteinemia em ratos machos adultos (Singh et al., 2011). Em trabalho com ratos adultos desenvolvido por Tsurugizawa et al. (2009), o fornecimento de GM em concentração de 60 mmol/L na água, resultou em aumento da termogênese, além de ser eficaz em prevenir a obesidade quando ocorre excessos de alimentação.

Na presente pesquisa o uso de 1% de AG (equivalente a uma média de 0,478 mg/g de peso vivo) não alterou nenhum dos parâmetros plasmáticos, concordando com Ahluwalia e Malik. (1989) que não evidenciaram alterações das lipoproteínas plasmáticas suplementando ratos adultos com doses de GM de 2 mg/g de peso vivo. Porém, ratos suplementados com GM com doses de 4 e 8 mg/g de peso vivo apresentaram redução dos níveis de HDL e aumento dos níveis de LDL colesterol, mas o colesterol total não foi afetado; já doses de 8 mg/g de peso vivo aumentaram os níveis de triglicérides e de VLDL colesterol (Singh et al., 2011). As diferenças de respostas do glutamato no perfil lipídico no plasma e sangue, portanto, estão relacionadas, além da espécie e idade dos animais, também a dose utilizada nas dietas.

A alteração verificada nos teores das lipoproteínas plasmáticas em relação a idade dos leitões, corroboram os resultados obtidos por Graf et al. (1998) que verificaram diminuição na concentração de colesterol total no plasma com o aumento da idade de leitões, passando de 169 mg/dL aos 21 dias para 42 mg/dL aos 56 dias de idade.

A inclusão de 0,1% de NU nas dietas não influenciou o *turnover* do  $^{13}\text{C}$ , entretanto, Amorim (2012), utilizando a técnica de isótopos estáveis, constatou *turnover* do carbono mais rápido na mucosa do duodeno e do jejuno de leitões desmamados alimentados com dietas suplementadas com 1,00% de NU a base de guanilato e inosinato. Apesar de utilizar a mesma fonte de nucleotídeos, o nível avaliado no presente experimento foi dez vezes menor, o que poderia justificar a ausência de efeitos verificados no *turnover* do  $^{13}\text{C}$ .

As divergências nos resultados das pesquisas com NU provavelmente estão relacionadas a composição em nucleotídeos da fonte utilizada, do nível normalmente presente nos ingredientes e do nível de inclusão nas dietas, bem como as diferenças nas exigências dos animais determinada, principalmente, pelo potencial de crescimento, pois na presente pesquisa, foi demonstrado que apesar da ausência de resultados dos aditivos sobre o *turnover* do  $^{13}\text{C}$  na mucosa intestinal, os leitões com maior taxa de crescimento (médios e pesados) apresentaram menores valores de meia-vida do carbono na mucosa do jejuno, comparado com os animais de menor taxa de crescimento (leves).

O leite fornece grandes quantidades de glutamato para satisfazer as exigências dos leitões lactentes (Haynes et al., 2009; Wu et al., 2011), entretanto, a troca do leite

pela ração sólida durante o desmame, além de outros fatores estressantes, resulta em diminuição da ingestão de alimentos e na ocorrência de atrofia das vilosidades intestinais (Li et al., 2009; Wu et al., 1994), principalmente em consequência das altas taxas de renovação celular e apoptose nos leitões jovens que não receberam nutrientes suficientes para atender a exigência para a síntese de proteínas corporais e adequado desenvolvimento da mucosa, prejudicando a digestão e a absorção de nutrientes (Lalles et al., 2004; Ou et al., 2007; Pluske et al., 1997).

A quase totalidade do glutamato da dieta de animais jovens é utilizado no intestino, tanto para formação de ATP quanto para sua conversão em outros aminoácidos (Burrin e Stoll, 2009). Além disso, é considerado um neurotransmissor excitatório, que regula a motilidade do trato gastrointestinal (Kirchgessner, 2001), que pode ser potencializada com o uso de 5'-ribonucleotídeos (inosinato e guanilato) (Damak et al., 2003; Kusuhara et al., 2013; Zhao et al., 2003). Outro fator de importante destaque do AG é o potencial de reduzir o pH da dieta, 1% de AG, reduziu em aproximadamente 0,80 unidades de pH em relação ao tratamento sem adição do mesmo. Apesar de ser uma quantidade expressiva, o pH da digesta não foi analisado no experimento.

A utilização de 1% de glutamato diminuiu a atrofia das vilosidades intestinais causadas pelas baixas condições de alimentação durante a desmama (Liu et al., 2002) e comprometer produção de outros aminoácidos (L-alanina, L-aspartato, L-ornitina e L-prolina) por participar de suas sínteses (Reeds et al., 1997). Na presente pesquisa, entretanto, não foi possível observar alterações nos parâmetros de desempenho e no *turnover* do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do intestino delgado dos leitões quando foi utilizado 1% de AG nas dietas.

A técnica de estudo com isótopos naturais do carbono tem possibilitado comprovar redução nos valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  na mucosa intestinal de leitões alimentados com dietas adicionadas com 1% de glutamina (Caldara et al., 2010) ou 1% de ácido glutâmico (Amorim, 2012) sugerindo que esses aditivos aceleram o processo de recuperação da mucosa intestinal após o desmame. Entretanto, o *turnover* do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno e jejuno dos leitões no presente trabalho não foi influenciado pela adição de 1% de AG nas dietas.

A ausência de resultados verificada com a adição de ácido glutâmico nas dietas no desempenho e na velocidade de troca do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno e do jejuno dos leitões pode estar relacionada com o fato de terem sido utilizadas dietas com maiores níveis de aminoácidos digestíveis e de lactose, pois trabalhando com leitões desmamados dos 21 aos 42 dias de idade, alimentados com dietas simples a base de milho e farelo de soja, suplementada com 0,0; 0,5; 1; 2 e 4% de GM, Rezaei et al. (2013) verificaram melhora no ganho de peso e na conversão alimentar, bem como aumento na altura das vilosidades do jejuno dos animais até o nível de 4% de GM.

Alguns autores tem relatado a existência de sinergismo do glutamato com NU de bases púricas como potencializadores de sabor em humanos (Cairolí et al., 2008) e ratos (Yamaguchi e Ninomiya, 2000), porém, na presente pesquisa não foi verificado efeito do uso desses aditivos no consumo de ração dos leitões.

### **Conclusões**

A adição de NU e AG nas dietas não interfere no desempenho, no perfil lipídico plasmático e no *turnover* do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno e jejuno de leitões desmamados.

As variáveis de perfil lipídico plasmático de leitões se reduzem com aumento da idade.

A categoria de peso dos leitões afeta a meia-vida do  $\delta^{13}\text{C}$  na mucosa intestinal.

### **Referências**

- Ahluwalia, P., Malik, V.B., 1989. Effects of monosodium glutamate (MSG) on serum lipids, blood glucose and cholesterol in adult male mice. *Toxicol Lett.* 45, 195-198.
- Amorim, A.B., 2012. Efeito da glutamina, do glutamato e de nucleotídeos sobre o turnover do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em tecidos de leitões desmamados. Tese Doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.
- Burrin, D.G., Stoll, B., 2009. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 850–856.
- Cairolí, P., Pieraccini, S., Sironi, M., et al, 2008. Studies on umami taste. Synthesis of new guanosine 5'-phosphate derivates and their synergistic effect with monosodium glutamate. *J. Agric. Food. Chem.* 56, 1043-1050.
- Caldara, F.R., Ducatti, C., Berto, D.A., et al, 2010. Glutamina e *turnover* do carbono da mucosa intestinal de leitões desmamados. *Br. J. Anim. Sci.* v.39, p.2664-2669.

- Calson, M.S., Veum, T.L., Turk, J.R., 2005. Effects of yeast extract versus animal plasma in weanling pig diets on growth performance and intestinal morphology. *J. Swine Health Prod.* 13, 204-209.
- Carver, J. D., Walker. W. A., 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 6, 58–72.
- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., et al, 2003. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Sci.* 301, 850 –853.
- Domeneghini, C., Di Giancamillo, A., Savoini, G., et al, 2004. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. *Histol. Histopathol.* 19, 49-58.
- Dong, X.F., Gao, W.W., Tong, J.M., et al, 2007. Effect of polysavone (Alfafa Extract) on abdominal fat deposition and immunity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86. 1995-1959.
- Ducatti, C., Carrijo, A.S., Pezzato, A.C., et al, 2002. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Sci. Agríc.* 59, 29-33.
- Graf, T. L., Boleman, S. L., Krook, L. P., et al, 1998. Effect of Neonatal Dietary Cholesterol Deprivation in Pigs With Genetically High or Low Plasma Cholesterol on Plasma Lipids and Early Atherogenesis. *Nutr. Res.* 8, 1615-1629.
- Haynes, T.E., Li, P., Li, X.L., et al, 2009. L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant - or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes. *Amino Acids.* 37, 131–142.
- Hedemann, M.S., Hojsgard, S., Jensen, B.B., 2003. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 87, 32-41.
- Holen, E., Jonsson, R., 2004. Dietary nucleotides and intestinal cell lines: 1. Modulation of growth. *Nutr. Res.* 24, 197-207.
- Kirchgesner, A.L., 2001. Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 1, 591–596.
- Kondoh, T., Torii, K., 2008. Brain Activation by Umami Substances via Gustatory and Visceral Signaling Pathways, and Physiological Significance. *Biol, Pharmaceutical Bulletin.* 31, 1827-1832.
- Kusuhara, Y., Yoshida, R., Ohkuri, T., et al, 2013. Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *J. Physiology.* 591, 1967–1985.

- Lalles, J., Boudry, G., Favier, C., et al, 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53, 301-316.
- Lee, D.N., Liu, S.R., Chen, Y.T., et al, 2007. Effects of diets supplemented with organic acids and nucleotides on growth, immune response and digestive tract development in weaned pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91, 508-518.
- Li, P., Kim, S.W., Li, X.L., et al, 2009. Dietary supplementation with cholesterol and docosa-hexaenoic acid affects concentrations of amino acids in tissues of young pigs. *Am. Acids.* 37, 709–716.
- Liu, T., Peng, J., Xiong, Y., et al, 2002. Effects of dietary glutamine and glutamate supplementation on small intestinal structure, active absorption and DNA, RNA concentrations in skeletal muscle tissue of weaned piglets during d 28 to 42 of age. *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 15, 238–242.
- Mateo, C.D., 2005. Aspects of nucleotide nutrition in pigs. PhD Diss. South Dakota State Univ., Brookings, SD.
- Mohebbi, A., Nematollahi, A., Gholamhoseini, A., et al, 2013. Effects of dietary nucleotides on the antioxidant status and serum lipids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 19, 506-514.
- Newsholme, P., Procopio, J., Ramos Lima, M.M., et al, 2003. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem. Function.* 21, 1–9.
- Nishizawa, N., Harada, Y., Fujimoto, M., 1996. Effect of dietary nucleotides on cholesterol metabolism in mice. 70<sup>o</sup> Annual Meeting of Japan Society for bioscience, Biotechnology, and Agrochem. Tokyo. p. 15.
- Ou, D.Y., Li, D.F., Cao, Y.H., et al, 2007. Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the SI of weanling pigs. *J. Nutr. Biochem.* 18, 820–826.
- Pluske, J.R., Hampson, D.J., Williams, I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pigs: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51, 215-236.
- Reeds, P.J., Burrin, D.G., Stoll, B., et al, 1997. Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in the fed piglets. *Anim. J. Physiol.* 273, 408-415.
- Reeds, P.J., Burrin, D.G., Stoll, B., et al, 2000. Intestinal glutamate metabolism. *J. Nutr.* 130, 978-982.

- Rezaei, R., Knabe, D.A., Tekwe, C.D., et al, 2013. Dietary supplementation with monosodium glutamate is safe and improves growth performance in postweaning pigs. *Am. Acids.* 44, 911-923.
- Rossi, P., Xavier, E.G., Rutz, F., 2007. Nucleotídeos na nutrição animal. *Rev. Bra. Agroec.* 13, 05-12.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., et al, 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais (3rd ed.). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Sanchez-Pozo, A., Pita, M. L., Martinez, A., et al, 1986. Effect of dietary nucleotides upon lipoprotein pattern of newborn infants. *Nutr. Res.* 6, 53-57.
- Sauer, N., Bauer, E., Mosenthin, R., 2012. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 3126–3134.
- Schlimme, I.R., Martin, D., Meisel, H., 2000. Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84, 59-68.
- Singh, K., Sharma, J., Kaur, A., et al, 2011. Alteration upon oral ingestion of monosodium glutamate various lipid and lipoprotein fractions in serum of adult male rat. *J. Life Sci.* 3, 17-21.
- Stein, H.H., Kil, D.Y., 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs; Dietary tools, part 2. *Anim. Biotechnol.* 17, 217-231.
- Tsurugizawa T, Uematsu A, Nakamura E., et al, 2009. Mechanisms of neural response to gastrointestinal nutritive stimuli: the gut–brain axis. *Gastroenterology.* 137, 262–73.
- Uauy, R., Quan, R., Gil, A., 1994. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J. Nutr.* 124, 1436-1441.
- Weaver, A.C., Kim, S.W., 2014. Supplemental nucleotides high in inosine 5'-monophosphate to improve the growth and health of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 95, 645-651.
- Wu, G., Borbolla, A.G., Knabe, D.A., 1994. The uptake of glutamine and release of arginine, citrulline and proline by the small intestine of developing pigs. *J. Nutr.* 124, 2437–2444.
- Wu, G., Bazer, F.W., Johnson, G.A., et al, 2011. Important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *J. Anim. Sci.* 89, 2017–2030.
- Yamaguchi, S., Ninomiya, K., 2000. Umami and food palatability. *J. Nutr.* 130, 921–926.

Yamaguchi, S., 1967. The synergistic effect of monosodium glutamate and disodium 5'-inosinate. *J. Food Sci.* 32, 473–478.

Young, V. R., Ajami, A. M., 2000. Glutamate: An amino acid of particular distinction. *J. Nutr.* 130, 892-900.

Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., et al, 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell.* 115, 255–266.

**Tabela 1**

Composição percentual nutricional e valores do  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) e do pH das rações pré-iniciais I, pré-iniciais II e iniciais (Experimentos 1 e 2)<sup>1</sup>.

Ingredientes	Rações pré-iniciais I				Rações pré-iniciais II				Rações Iniciais			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Arroz, Quirera	53,50	53,40	52,50	52,40	57,70	57,60	56,70	56,60	65,33	65,23	64,33	64,23
Soja, Farelo 45%	20,00	20,00	20,00	20,00	24,00	24,00	24,00	24,00	28,00	28,00	28,00	28,00
Soro de leite seco	6,50	6,50	6,50	6,50	3,00	3,00	3,00	3,00	-	-	-	-
Açúcar	4,00	4,00	4,00	4,00	3,00	3,00	3,00	3,00	-	-	-	-
Maltodextrina	4,00	4,00	4,00	4,00	2,30	2,30	2,30	2,30	-	-	-	-
Concentrado Proteico Soja	2,51	2,51	2,51	2,51	2,00	2,00	2,00	2,00	0,50	0,50	0,50	0,50
Farelo de Glúten 60%	2,60	2,60	2,60	2,60	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Óleo de soja	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
Fosfato Bicálcico	1,85	1,85	1,85	1,85	1,75	1,75	1,75	1,75	1,65	1,65	1,65	1,65
Calcário	0,73	0,73	0,73	0,73	0,77	0,77	0,77	0,77	0,73	0,73	0,73	0,73
Cloreto de sódio	0,53	0,53	0,53	0,53	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-Lisina HCL 78%	0,81	0,81	0,81	0,81	0,58	0,58	0,58	0,58	0,34	0,34	0,34	0,34
DL-Metionina 99%	0,28	0,28	0,28	0,28	0,19	0,19	0,19	0,19	0,08	0,08	0,08	0,08
L-Treonina 98%	0,34	0,34	0,34	0,34	0,24	0,24	0,24	0,24	0,13	0,13	0,13	0,13
L-Triptofano 98%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	-	-	-	-
L-Isoleucina 99%	0,08	0,08	0,08	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Valina 96,5%	0,22	0,22	0,22	0,22	0,09	0,09	0,09	0,09	-	-	-	-
Óxido de Zinco	0,34	0,34	0,34	0,34	0,20	0,20	0,20	0,20	-	-	-	-
Sulfato de Cu Pentahidratado	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	0,08	0,08	0,08
Cloreto de colina 60%	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Antioxidante BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix mineral <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico <sup>3</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Acido Glutâmico	-	-	1,00	1,00	-	-	1,00	1,00	-	-	1,00	1,00
Nucleotídeos	-	0,10	-	0,10	-	0,10	-	0,10	-	0,10	-	0,10
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-26,9	-26,8	-26,7	-26,7	-27,9	-27,8	-28,0	-27,7	-28,9	-28,8	-28,8	-28,5
pH	5,96	5,94	5,15	5,12	5,74	5,76	5,07	5,07	5,91	5,97	5,26	5,23
<b>Valores nutricionais calculados<sup>5</sup></b>												
EM (kcal/kg)	3404	3400	3404	3400	3382	3379	3382	3379	3353	3350	3353	3350
PB (%)	18,94	18,94	19,43	19,42	19,50	19,49	19,98	19,97	19,58	19,57	20,06	20,06
Lisina dig (%)	1,45	1,45	1,45	1,45	1,33	1,33	1,33	1,33	1,17	1,17	1,17	1,17
Metionina dig. (%)	0,56	0,56	0,56	0,56	0,48	0,48	0,48	0,48	0,38	0,38	0,38	0,38
Treonina dig. (%)	0,91	0,91	0,91	0,91	0,84	0,84	0,84	0,84	0,74	0,74	0,74	0,74
Triptofano dig. (%)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,22	0,22	0,22	0,22
Met+Cist dig. (%)	0,81	0,81	0,81	0,81	0,75	0,75	0,75	0,75	0,65	0,65	0,65	0,65
Isoleucina dig. (%)	0,86	0,86	0,86	0,86	0,76	0,76	0,76	0,76	0,78	0,78	0,77	0,77
Valina dig. (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	0,92	0,92	0,91	0,91	0,85	0,85	0,85	0,85
Cálcio (%)	0,86	0,86	0,86	0,86	0,83	0,83	0,83	0,83	0,77	0,77	0,77	0,77
Fósforo disp. (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,41	0,41	0,41	0,41	0,38	0,38	0,38	0,38

<sup>1</sup>R1: Ração controle sem adição de Acido Glutâmico e Nucleotídeos; R2: Ração com adição de 0,1% de Nucleotídeos; R3: Ração com adição de 1,00% de Acido Glutâmico ; R4: Ração com adição de 0,1% de Nucleotídeos e de 1,00% de Acido Glutâmico. <sup>2</sup>Premix mineral fornecendo por kg de ração: 100 mg Fe, 10 mg Cu, 0,3 mg de Se, 40 mg Mn, 100 mg Zn, 1 mg de Co, 1,5 mg I; <sup>3</sup> Premix vitamínico fornecendo por kg de ração: 9000 UI vit. A, 2250 UI vit. D3, 22,5 mg vit E, 22,5 mg vit. K3, 2,03 mg vit. B1, 6 mg vit. B2, 3 mg vit. B6, 30 µg vit. B12, 0,9 mg ácido fólico, 14,03 mg ácido pantotênico, 30 mg niacina, 0,12 mg biotina, 400 mg de colina.

**Tabela 2**

Efeito de nucleotídeos (NU) e ácido glutâmico (AG) no ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) de leitões nos períodos experimentais (Experimento 1)<sup>1</sup>.

	GDP (g)			CDR (g)			CA		
	Período (dias)								
	0 a 15	0 a 27	0 a 35	0 a 15	0 a 27	0 a 35	0 a 15	0 a 27	0 a 35
Nucleotídeo (NU)									
<i>Ausente</i>	276	397	417	375	598	677	1,36	1,50a	1,62
<i>Presente</i>	260	383	406	355	588	661	1,36	1,53b	1,62
Ácido Glutâmico (AG)									
<i>Ausente</i>	267	391	411	366	600	675	1,37	1,53	1,63
<i>Presente</i>	269	389	412	364	587	663	1,35	1,51	1,61
	Valor de <i>P</i>								
NU	0,12	0,40	0,51	0,18	0,79	0,63	0,73	0,05	0,88
AG	0,99	0,64	0,85	0,63	0,33	0,42	0,42	0,14	0,07
NU x AG	0,22	0,16	0,08	0,12	0,19	0,18	0,51	0,68	0,27
CV(%) <sup>2</sup>	8,97	8,28	7,17	9,02	8,10	7,63	5,21	2,40	2,35

<sup>1</sup>Médias nas colunas com letras distintas para Nucleotídeo diferem entre si pelo Teste F ( $P < 0,05$ ); <sup>2</sup>Coefficiente de variação.

**Tabela 3**

Efeito de nucleotídeos (NU), ácido glutâmico (AG) e da idade dos leitões nos teores plasmáticos de colesterol total, triglicérides, HDL colesterol e LDL + VLDL colesterol (experimento 1)<sup>1</sup>.

	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL+VLDL (mg/dL)
<i>Média dos fatores</i>				
Nucleotídeo				
<i>Ausente</i>	73,96	35,48	31,65	43,05
<i>Presente</i>	75,76	32,38	32,78	42,24
Ácido Glutâmico				
<i>Ausente</i>	75,51	34,67	32,74	42,71
<i>Presente</i>	74,21	33,19	31,69	42,57
CV <sup>2</sup>	8,97	6,76	8,28	9,18
Idade (dias)				
21	217,0a	78,0a	50,4a	166,6a
56	74,9b	33,9b	32,2b	42,6b
CV <sup>3</sup>	21,20	47,00	7,20	29,60
	Valor de <i>P</i>			
Nu	0,60	0,31	0,45	0,80
AG	0,69	0,62	0,47	0,97
AG x NU	0,21	0,85	0,53	0,26
Idade	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

<sup>1</sup>Médias com letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo Teste F ( $P < 0,0001$ ); <sup>2</sup>Coefficiente de variação dos tratamentos; <sup>3</sup>Coefficiente de variação da idade.

**Tabela 4**

Efeito de nucleotídeos (NU) e ácido glutâmico (AG) sobre os valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  (*turnover* 50%) na mucosa do duodeno e jejuno de leitões desmamados (experimento 1).

	<i>Turnover</i> 50% (dias) <sup>1</sup>	
	Mucosa Duodeno	Mucosa Jejuno
Nucleotídeo		
<i>Ausente</i>	7,27	6,13
<i>Presente</i>	7,06	6,51
Ácido Glutâmico		
<i>Ausente</i>	7,48	5,67
<i>Presente</i>	6,85	6,97
	Valor de <i>P</i>	
NU	0,68	0,66
AG	0,26	0,15
NU*AG	0,87	0,60
CV(%) <sup>2</sup>	12,01	21,90

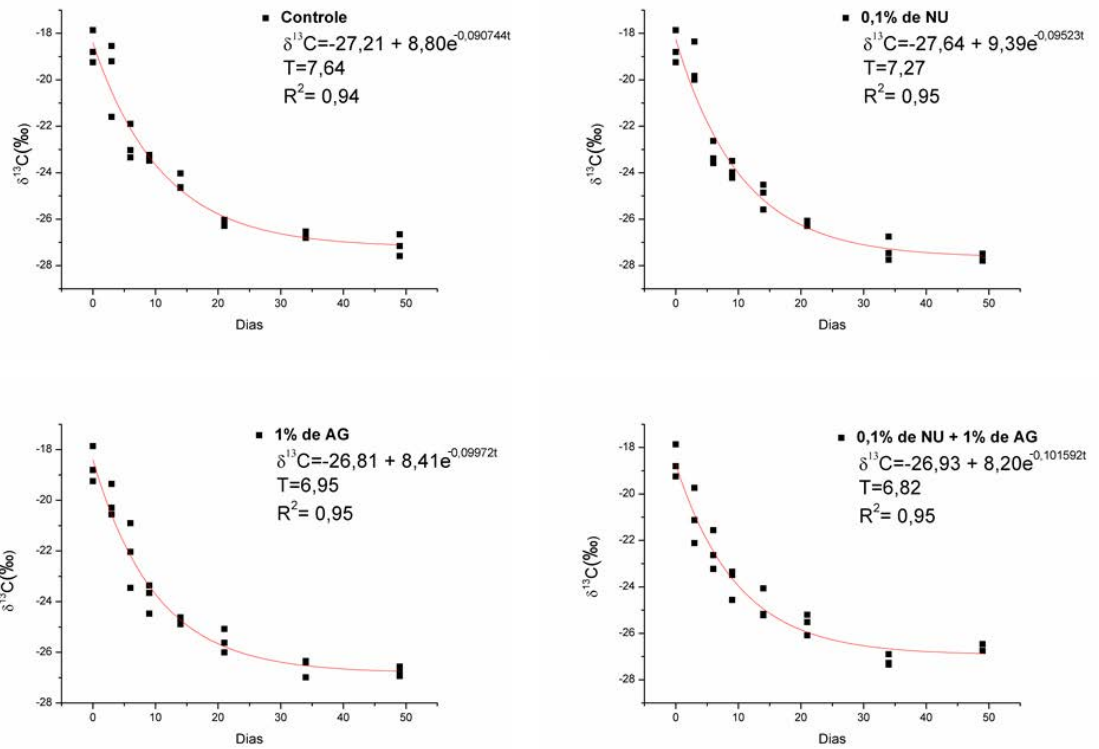
<sup>1</sup>Não Significativo <sup>2</sup>Coefficiente de variação.

**Tabela 5**

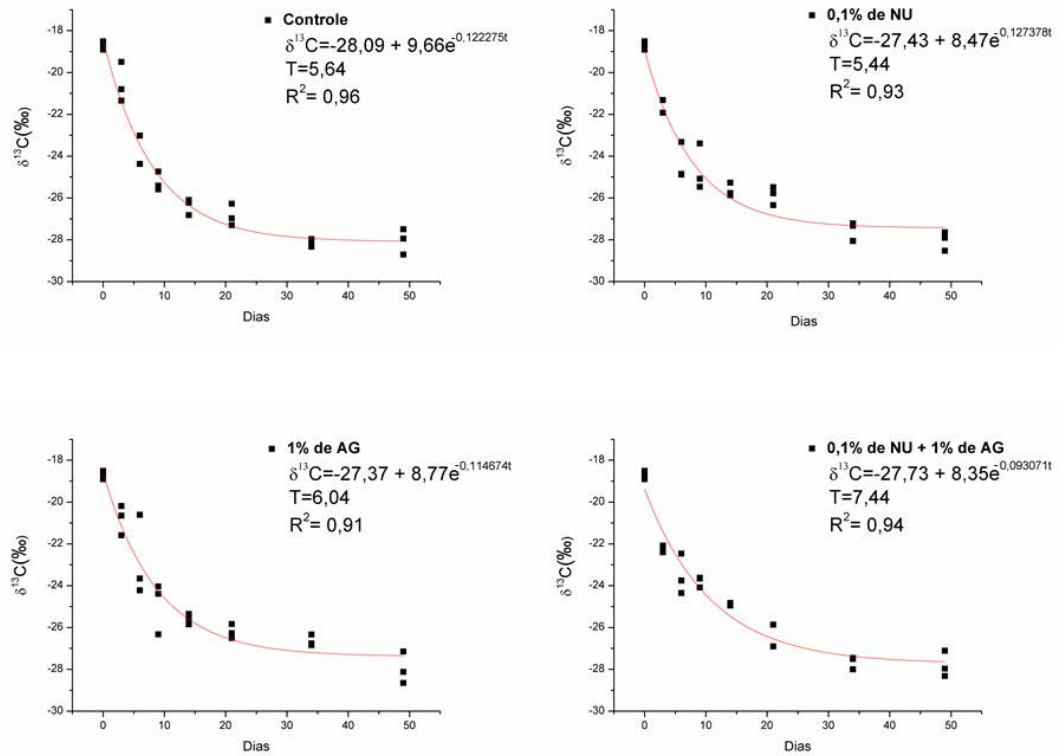
Efeito da categoria de peso dos leitões sobre os valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  (*turnover* 50%) na mucosa do duodeno e jejuno de leitões desmamados (experimento 2).

	<i>Turnover</i> 50% (dias) <sup>1</sup>	
	Mucosa Duodeno	Mucosa Jejuno
Peso		
Leves	6,94	8,10a
Médios	7,08	5,47b
Pesados	7,48	5,39b
Valor de <i>P</i>	0,67	0,05
CV(%) <sup>2</sup>	12,01	21,90

<sup>1</sup> Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste de F ( $P \leq 0,05$ ) <sup>2</sup> Coeficiente de variação.



**Figura 2.** Representação das equações de enriquecimento isotópico para cada um dos tratamentos durante o período experimental e valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do duodeno (experimento 2).



**Figura 3.** Representação das equações de enriquecimento isotópico para cada um dos tratamentos durante o período experimental e valores de meia-vida do  $^{13}\text{C}$  na mucosa do jejuno (experimento 2).

### **CAPÍTULO III**

## **IMPLICAÇÕES**

O uso de nucleotídeos e ácido glutâmico na dieta dos leitões não demonstraram benefícios quando utilizados individualmente ou em conjunto em dietas relativamente complexas, portanto futuros estudos deverão ser realizados para verificar se a utilização desses aditivos pode diminuir os efeitos de uma dieta menos complexa no desempenho dos animais.

Grande número de trabalhos utilizando nucleotídeos não informam a composição da sua fonte, dificultando uma melhor definição de sua especificidade para leitões desmamados.