



JOANA BARRETO

**PROGRAMA DE USO TERAPÊUTICO E SUBTERAPÊUTICO DE
ÓLEOS ESSENCIAIS EM SUBSTITUIÇÃO AOS ANTIBIÓTICOS
PARA SUÍNOS**

LAVRAS – MG

2019

JOANA BARRETO

**PROGRAMA DE USO TERAPÊUTICO E SUBTERAPÊUTICO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS EM SUBSTITUIÇÃO AOS ANTIBIÓTICOS PARA SUÍNOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia, área de concentração em
Nutrição e Produção de Não
Ruminantes, para obtenção do
título de Mestre.

Prof. Dr. Vinícius de Souza Cantarelli
Orientador

Prof. Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu
Prof. Dr. Rony Antonio Ferreira
Coorientadores

LAVRAS – MG
2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Barreto, Joana.

Programa de uso terapêutico e subterapêutico de óleos
essenciais em substituição aos antibióticos para suínos / Joana
Barreto. - 2019.

93 p.

Orientador(a): Vinícius de Souza Cantarelli.

Coorientador(a): Márvio Lobão Teixeira de Abreu, Rony
Antonio Ferreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Antibióticos. 2. Óleos essenciais. 3. Suínos. I. Cantarelli,
Vinícius de Souza. II. Lobão Teixeira de Abreu, Márvio. III.
Ferreira, Rony Antonio. IV. Título.

JOANA BARRETO

**PROGRAMA DE USO TERAPÊUTICO E SUBTERAPÊUTICO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS EM SUBSTITUIÇÃO AOS ANTIBIÓTICOS PARA SUÍNOS**

**PROGRAM FOR THERAPEUTIC AND SUBTHERAPEUTIC USE OF
ESSENTIAL OILS REPLACING ANTIBIOTIC FOR SWINE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, área de concentração em
Nutrição e Produção de Não
Ruminantes, para obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 28 de maio de 2019

Prof. Dr. Vinícius de Souza Cantarelli UFLA

Prof. Dr. Rony Antonio Ferreira UFLA

Prof. Dr. Leandro Batista Costa PUCPR

Prof. Dr. Vinícius de Souza Cantarelli

Orientador

LAVRAS- MG

2019

*A minha família por sempre confiar e acreditar em mim e a todos que fizeram parte
dessa conquista.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus caminhos e manter a minha fé naquilo que eu acredito e busco alcançar todos os dias.

A minha família, minha mãe Iara, por me dar a maior oportunidade que eu poderia ter na vida, pelo exemplo de ser humano e amor. A minha tia Aida, pelo exemplo de força, determinação, pelo apoio e amor. Ao meu irmão Gabriel, pelo companheirismo, proteção, inspiração e amor. A minha avó Ermita (*in memoriam*), pelos cuidados, pelo exemplo de vida e pelo amor.

A Laura, por todo apoio, companheirismo e amor em todos os momentos.

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, por toda contribuição durante a graduação acadêmica e pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Vinícius de Souza Cantarelli pelas oportunidades, conhecimentos, ensinamentos, apoio e experiências compartilhadas que foram fundamentais para a conclusão dessa etapa.

Aos professores, Márvio Lobão Teixeira de Abreu e Rony Antonio Ferreira pela coorientação, conhecimentos e apoio durante a pós-graduação.

Ao professor Roberto Maciel de Oliveira, pelos conhecimentos transmitidos, apoio e amizade conquistada desde a graduação.

Ao professor Leandro Batista Costa, por ter aceitado o convite e pelas contribuições feitas como membro da banca de defesa.

A linha de pesquisa Aditivos e Saúde Intestinal, por toda troca de conhecimentos, trabalho em equipe, parcerias e amizade.

Ao Núcleo de Estudos em Suinocultura (NESUI), pelo acolhimento, pelos conhecimentos proporcionados e pelas oportunidades.

A GRASP Indústria e Comércio Ltda, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

As grandes amigas que fiz durante esses dois anos, a Jessica Barbosa, Cândida e Jessica Resende pela amizade, companheirismo, apoio nas horas mais difíceis, sempre buscando nos manter motivadas para vencer os desafios diários.

Ao doutorando Lucas Alves Rodrigues, pelos conhecimentos transmitidos, paciência e apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO GERAL

Objetivou-se avaliar o efeito de óleos essenciais em substituição a um programa de uso de antibióticos sobre a saúde intestinal e o desempenho de leitões recém-desmamados desafiados com *Echerichia coli* K88 + na fase de creche e, posteriormente nas fases de crescimento e terminação. O experimento foi realizado no Centro Experimental de Suínos, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram utilizados 108 leitões (machos castrados), com peso inicial de $6,3 \pm 0,44$ kg e 23 dias de idade, distribuídos em blocos casualizados com nove repetições e quatro leitões por parcela experimental em 3 tratamentos por 127 dias: dieta controle negativo sem a adição de nenhum aditivo (CN); controle positivo: CN + antibiótico (CP); óleos essenciais: CN + *blend* de óleos essenciais composto por 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol. (OE). Foi fornecida uma dose terapêutica de gentamicina (270 mg/kg) para o tratamento CP e uma dose terapêutica do *blend* (40 mg/kg) para o tratamento OE nos primeiros sete dias da fase de creche e, durante o restante do período, uma dose subterapêutica de halquinol (20 mg/kg) para o tratamento CP e uma dose subterapêutica (30 mg/kg) do *blend* para o tratamento OE. Nos dez primeiros dias da fase de crescimento e terminação, foi fornecida uma dose terapêutica (45 mg/kg) de tilosina para o tratamento CP e uma dose terapêutica (40 mg/kg) do *blend* para o tratamento OE e, considerando o restante dos períodos, uma dose subterapêutica de enramicina para o CP no crescimento (12,5 mg/kg) e terminação (6,3 mg/kg) e uma dose subterapêutica (20 mg/kg) do *blend* para o tratamento OE. Nos dias 1,2 e 3 de experimento, todos os leitões foram desafiados com *E. coli* K88+ (1mL a cada dia, 10^7 UFC/ml). Dois dias antes de serem transferidos para a instalação de crescimento e terminação, os animais foram submetidos ao estresse por calor (média de 31,8 °C no primeiro dia e 31,7°C no segundo dia). Foi utilizado o teste de Tukey para a comparação das médias. Não foram observadas diferenças significativas para o desempenho na fase de creche ($P>0,05$). A incidência de diarreia foi menor nos leitões do CP de 0 a 7 dias ($P<0,05$) e reduziu nos animais do OE de 14 a 28 dias ($P<0,05$). A morfologia intestinal, contagem microbiológica, produção de ácidos graxos voláteis, atividade antioxidante e expressão gênica intestinal não foram influenciadas pelos tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para TNF- α nos dias avaliados. Já IL-10 foi menor no tratamento OE comparado ao CP no dia 3, após o desafio e menor comparado ao CN no dia 10 ($P<0,05$). Foi observado maior ganho de peso diário e consumo de ração diário no OE durante a dosagem terapêutica na fase de terminação comparado ao CN ($P<0,05$). Sugere-se com esses resultados que a dose terapêutica de OE tenha um efeito benéfico no desempenho dos animais comparado aos antibióticos além de atenuar a resposta inflamatória, se caracterizando como um possível substituído aos programas de uso dos antibióticos.

Palavras-chave: Aditivo; Desempenho; Imunidade; Leitão.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of essential oils replacing growth promoter antibiotics on intestinal health and the performance of newly weaned piglets challenged with *E. coli* K88 + in the nursery and the growing-finishing phase. The experiment was carried out at Experimental Center of Swine, Department of Animal Science, Federal University of Lavras – UFLA. A total of 108 barrows (6.3 ± 0.44 kg) were weaned at 23 days of age were distributed in randomized blocks with nine replications and four piglets per experimental plot in three treatments for 127 days: negative control diet without the addition of additives (NC); positive control: NC + antibiotic (PC); Essential oils: NC + essential oils blend consisting of 12% carvacrol and 6% cinnamaldehyde, capsaicin, anethole and cineol. (EO). A therapeutic dose of gentamicin (270 mg / kg) was provided for PC treatment and a blend therapeutic dose (40 mg / kg) for EO treatment during the first seven days of the day nursery phase and for the remainder of the period sub-therapeutic halquinol dose (20 mg / kg) for the PC treatment and a sub-therapeutic dose (30 mg / kg) of the blend for the EO treatment. In the first ten days of the growth and finishing phases, a therapeutic dose (45 mg / kg) of tylosin was provided for the PC treatment and a therapeutic dose (40 mg / kg) of the blend for the EO treatment and, considering the remainder of the periods, a subtherapeutic dose of enramycin for PC control in growth (12.5 mg / kg) and finishing (6.3 mg / kg) and a subtherapeutic dose (20 mg / kg) of the blend for the EO treatment. On days 1,2 and 3 of the experiment, all piglets were challenged with *E. coli* K88 + (1mL each day, 10^7 CFU / ml). Two days before being transferred to the growing and finishing facility, the animals were subjected to heat stress (average 31.8°C at day one and 31.7°C at day two). The Tukey test was used to compare the means. There was no treatment effect on growth performance during the nursery phase ($P > 0.05$). The incidence of diarrhea was lower in PC pigs from 0 to 7 days ($P < 0.05$) and decreased in EO pigs from 14 to 28 days ($P < 0.05$). Intestinal morphology, microbial counting, production of volatile fatty acids, antioxidant activity and intestinal gene expression were not influenced by treatments. There was no significant effect for TNF- α on the days evaluated, while IL-10 was lower in the EO pigs than in PC pigs at day 3 after challenge and lower than NC at day 10 ($P < 0.05$). Higher daily weight gain and daily feed intake were observed during the therapeutic dosing at the termination phase compared to NC ($P < 0.05$). These results suggest that the therapeutic dose of EO has a beneficial effect on animal performance compared to antibiotics and attenuates the inflammatory response, being a possible substitute for antibiotic use programs.

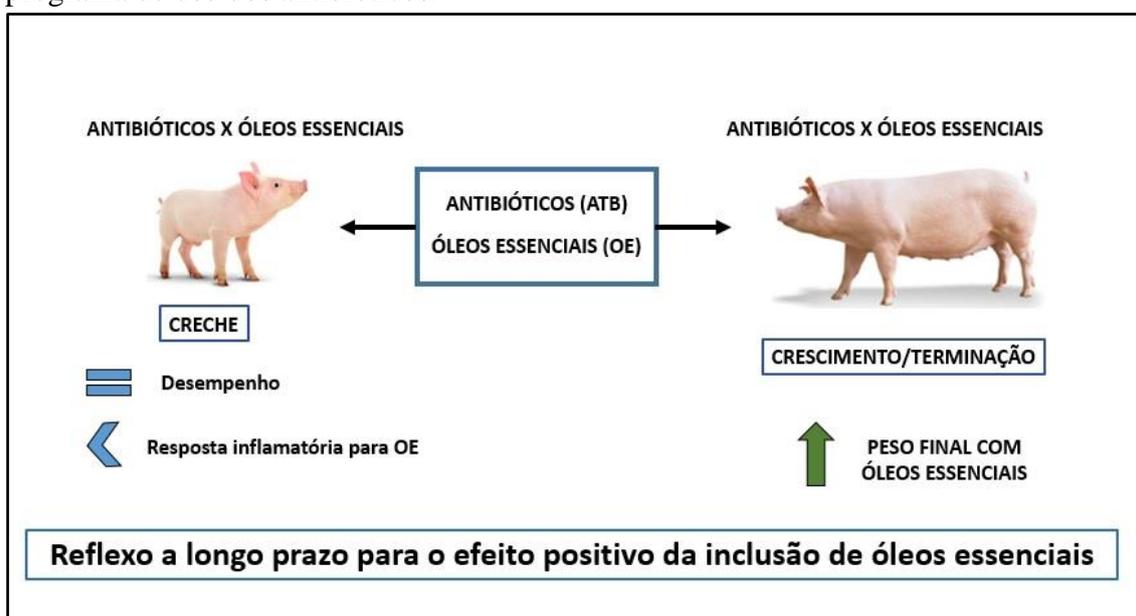
Keywords: Additives; Immunity; Performance; Piglet.

Óleos essenciais em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho para suínos na fase de creche, crescimento e terminação

Elaborado por **Joana Barreto** e orientado por **Vinicius de Souza Cantarelli**

Os antibióticos melhoradores de desempenho foram os principais produtos utilizados na alimentação de suínos com o intuito de minimizar os danos ocorridos principalmente na fase de creche e otimizar os índices zootécnicos e econômicos. A crescente restrição ao uso desses antimicrobianos devido a utilização indiscriminada pode favorecer o surgimento de cepas patogênicas resistentes aos tratamentos com antibióticos na saúde humana e animal, assim como a presença de resíduos nos produtos de origem animal. Os óleos essenciais extraídos de plantas têm sido explorados na alimentação de suínos, especialmente pelo seu potencial em substituir os antibióticos devido as suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladora. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de óleos essenciais em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho sobre o desempenho e a saúde intestinal de leitões recém-desmamados desafiados com *E. coli* K88 + na fase de creche e posteriormente na fase de crescimento e terminação.

O uso dos óleos essenciais mostrou-se eficiente em atenuar o processo inflamatório nos leitões na fase inicial e melhorou o ganho de peso diário na fase de crescimento e, principalmente, aumento no ganho de peso diário e consumo de ração diário com o uso da dose terapêutica na terminação. Sugere-se que os efeitos positivos dos óleos essenciais sejam refletidos em maior ganho de peso final quando comparado ao programa de uso dos antibióticos.



Principais efeitos do uso de óleos essenciais em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho para suínos na fase de creche, crescimento e terminação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Inclusão dos aditivos experimentais nas fases de creche, crescimento e terminação	67
Tabela 2 – Composição das dietas experimentais da fase de creche.....	68
Tabela 3 – Composição de dietas experimentais da fase de crescimento e terminação .	69
Tabela 4 - Registro da temperatura e umidade no primeiro dia de estresse por calor....	71
Tabela 5 - Registro da temperatura e umidade no segundo dia de estresse por calor	71
Tabela 6 - Efeito das dietas experimentais sobre ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e peso final em leitões desafiados com E.coli K88+.....	78
Tabela 7 - Efeito das dietas experimentais sobre ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e peso final em suínos na fase de crescimento.....	79
Tabela 8 - Efeito das dietas experimentais sobre ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e peso final em suínos na fase de terminação*	80
Tabela 9 - Efeito das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia em suínos desafiados com E. coli K88+ na fase de creche, crescimento e terminação*	81
Tabela 10 - Efeito das dietas experimentais sobre a altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação V:C, em μm , de leitões desafiados E. coli K88+	82
Tabela 11 - Efeito das dietas experimentais sobre a contagem de <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus</i> spp e <i>Bifidobacterium</i> spp do conteúdo cecal de leitões desafiados com E.coli K88+ (log UFC/g).....	82
Tabela 12 - Efeito das dietas experimentais sobre a produção cecal de ácido graxos voláteis, em mM/g de leitões desafiados com E.coli K88+	83
Tabela 13 - Efeito das dietas experimentais sobre a atividade antioxidante do jejuno de leitões desafiados com E.coli K88+	83
Tabela 14 - Expressão relativa de mRNA dos genes ocludina e GLP-2 do jejuno de leitões desafiados com E.coli K88+.....	84
Tabela 15 - Efeito das dietas experimentais sobre as concentrações de IL-10 e TNF- α (ng/ml) correspondentes ao terceiro e décimo dia experimental*	84

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	Referencial teórico.....	14
2.1	Características do período pós-desmame.....	14
2.2	Características fisiológicas dos leitões desmamados	15
2.3	Características da microbiota dos leitões desmamados	19
2.4	Resposta imunológica de leitões desmamados	25
2.5	Uso de antibióticos na produção de suínos.....	28
2.6	Óleos essenciais	32
2.6.1	Mecanismos de ação	34
2.6.2	Efeito na microbiota intestinal	36
2.6.3	Imunomodulação intestinal	37
2.6.4	Atividade antioxidante	38
2.6.5	Atividade enzimática	39
2.6.6	Desafios e perspectivas	40
3.	Considerações gerais	43
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

SEGUNDA PARTE

1.	INTRODUÇÃO	64
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1	Comissão de Ética no Uso de Animais.....	66
2.2	Local	66
2.3	Animais e instalações.....	66
2.4	Delineamento experimental	66
2.5	Tratamentos e dietas experimentais	66
2.6	Procedimentos experimentais.....	69
2.7	Desempenho e incidência de diarreia	71
2.8	Avaliação da morfologia intestinal	72
2.9	Análise microbiológica	72
2.10	Análise de ácidos graxos voláteis	73
2.11	Análise das enzimas antioxidantes.....	73
2.12	Análise imunológica: quantificação de citocinas no soro.....	75
2.13	Avaliação da permeabilidade intestinal	75
2.14	Análise estatística	77

3.	RESULTADOS.....	78
4.	DISCUSSÃO	85
5.	CONCLUSÃO	89
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A fase de creche representa um período crítico no sistema atual de produção de suínos, onde o desmame precoce tem grande contribuição no estresse causado aos leitões. Neste período, os animais estão mais vulneráveis às mudanças que ocorrem no novo ambiente como instalações, temperatura, dieta e manejos, bem como a agentes patológicos e alterações fisiológicas do trato gastrointestinal que podem ser relacionadas ao aumento na incidência de diarreia e menor desempenho, além do impacto negativo nas fases subsequentes.

Com o objetivo de minimizar os danos ocorridos principalmente nesta fase inicial e otimizar os índices zootécnicos e econômicos da produção de suínos, os antibióticos melhoradores de desempenho foram os principais produtos utilizados nas últimas décadas na alimentação animal. No entanto, nos últimos anos, a restrição ao uso desses antimicrobianos vem sendo crescente devido ao uso indiscriminado e frequente desses produtos que pode favorecer o surgimento de cepas patogênicas resistentes aos tratamentos com antibióticos na saúde humana e animal, assim como a presença de resíduos nos produtos de origem animal.

Diante destes desafios, é necessário buscar soluções como o desenvolvimento e a avaliação de aditivos alternativos que possam reduzir os prejuízos causados aos leitões no pós-desmame, melhorando o desempenho e a saúde intestinal dos animais. Dentre esses aditivos alternativos destacam-se os ácidos orgânicos, prebióticos e probióticos e os óleos essenciais. Os óleos essenciais são extraídos de plantas, constituídos por uma mistura de componentes voláteis, capazes de exercerem diferentes modos de ação como antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante.

O uso desses aditivos e seus efeitos devem ser avaliados em diferentes condições como uma alternativa viável à substituição dos antibióticos melhoradores de desempenho, sendo eficientes em sua utilização sem causar aumento dos custos de produção e redução do desempenho animal. Sendo assim, essa pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar o uso de um *blend* comercial de óleos essenciais em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho na saúde intestinal e desempenho de leitões desafiados com *Escherichia coli* K88+ no período de creche e posteriormente nas fases de crescimento e terminação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características do período pós-desmame

Naturalmente, o desmame em suínos acontece em torno de 10 a 12 semanas de idade, de maneira gradual e corresponde com o desenvolvimento quase que completo do sistema epitelial, imunológico e nervoso do trato gastrointestinal (MOESER et al., 2017). Nos sistemas de produção atual, esse período é reduzido pelo manejo das granjas que desmamam os leitões precocemente entre 21 e 28 dias de idade.

É um período considerado como um dos mais críticos e desafiadores, pois os leitões são submetidos a diferentes fontes de estresse. São mudanças marcantes como separação da mãe e mistura de lotes, adaptação às instalações, ambiente e consumo de um alimento sólido (PLUSKE et al., 1997; WEARY et al., 2008). Todas essas alterações ocorrem em um momento em que os leitões são mais vulneráveis por ainda possuírem um sistema imunológico imaturo, ineficiência na termorregulação, menor capacidade digestiva e uma instabilidade da microbiota intestinal (LE DIVIDICH & HERPIN 1994; LALLÈS et al., 2007b; WANG et al., 2013).

Durante a amamentação, os leitões ingerem o leite da porca que é rico em gordura, lactose e caseína sendo essa composição química compatível com a fisiologia digestiva dos animais nesse período (LALLÈS et al., 2004). Ao serem desmamados, passam a ingerir um alimento sólido e seco, pouco digestível, composto por proteína vegetal, amido e óleo, no entanto, não possuem um sistema digestório adequadamente desenvolvido para o melhor aproveitamento desses nutrientes e, conseqüentemente, um baixo desempenho (LANGE et al., 2010; KIM et al., 2012). De acordo com Brooks et al., (2003), aproximadamente 50% dos leitões desmamados consomem ração pela primeira vez em 24 horas e 10% dos leitões após 48 horas.

Devido a essas alterações nesse período é possível observar uma alta incidência de diarreia associada a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e uma redução do desempenho dos leitões (HEO et al., 2013). Ainda, de acordo com os mesmos autores, a diarreia se mantém ao longo de duas semanas após o desmame e representa um dos maiores problemas econômicos na produção de suínos pela mortalidade dos animais.

A prática mais utilizada para superar esse período crítico tem sido a utilização de antibióticos na alimentação dos animais. No entanto, frente às restrições do uso desses medicamentos como melhoradores de desempenho, produtores e pesquisadores têm buscado alternativas relacionadas a biossegurança (MADEC et al., 2000), gestão (HEO et al., 2013), genética (LUNNEY, 2007), nutrição e uso de aditivos (PLUSKE et al., 2002; LALLÈS et al.,

2007a) na tentativa de auxiliar os leitões a superarem os desafios do desmame precoce. Nesse sentido, o uso de óleos essenciais tem sido alvo de inúmeras pesquisas como possíveis substitutos aos antibióticos melhoradores de desempenho.

É importante compreender como os antibióticos e os aditivos alternativos interagem com o epitélio intestinal. Os principais aspectos que devem ser considerados incluem a capacidade digestiva, capacidade de absorção, barreiras químicas e físicas, microbiota e função imunológica. No entanto, obter dados de unidades comerciais que permitam uma avaliação mais detalhada de mecanismos ou avaliar uma gama de aditivos se torna desafiador, assim como representar adequadamente as condições comerciais em unidade de pesquisa (LANGE et al., 2010).

2.2 Características fisiológicas dos leitões desmamados

Diversas alterações enzimáticas, morfológicas e inflamatórias no trato gastrointestinal (TGI) dos leitões (PLUSKE et al., 2013) ocorrem logo após ao desmame. Conhecer as funções fisiológicas do TGI e as alterações que ocorrem durante esse processo são importantes para buscar alternativas que minimizem esses impactos negativos.

Segundo Montagne et al. (2007), a fase pós desmame pode ser dividida em uma fase aguda representada pelos cinco primeiros dias imediatamente após o desmame e uma fase adaptativa logo em seguida. Esses cinco primeiros dias é considerado o período em que os leitões sofreram o estresse mais severo do desmame (LI et al., 2018).

De acordo com Burrin & Stoll (2003), a principal diferença entre essas fases está associada ao consumo de ração e os impactos no TGI, já que o consumo de matéria seca compatível com aquele do período pré-desmame só acontece entre 7 e 14 dias pós-desmame. Ou seja, a deficiência em energia e nutrientes na fase aguda pode comprometer a recuperação e desenvolvimento do TGI na fase subsequente.

Na fase aguda, a redução do consumo de ração leva à uma menor taxa da proliferação celular, síntese proteica e atrofia das vilosidades (BURRIN & STOLL, 2003). Os componentes da dieta na fase de desmame, como glicinas e lectinas presentes na proteína vegetal é um fator contribuinte para a hiperplasia das criptas e da lâmina própria em resposta a hipersensibilidade intestinal a esses componentes (DREAU & LALLES, 1999). Contudo, essa resposta contribui para desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa pelo aumento da densidade das células linfóides na mucosa intestinal (KELLY & COUTTS, 2000).

Na fase adaptativa, ocorre um aumento no consumo de ração comparado a fase anterior. Essa recuperação na ingestão de alimento pode ser representada pelo desenvolvimento do TGI.

A fase adaptativa do desmame também é representada pelo aumento da secreção de enzimas digestivas, como proteases gástricas, proteases pancreáticas e atividade da α -amilase (BACH KNUDSEN & JORGENSEN, 2001).

O epitélio do intestino delgado representado pelas vilosidades e criptas sofrem alterações no momento do desmame. As células epiteliais desempenham funções importantes como digestão e absorção de nutrientes, além de formarem uma barreira contra patógenos e substâncias tóxicas presentes no lúmen intestinal (YANG et al., 2013).

As vilosidades revestem o epitélio intestinal e amplificam a área de superfície para o processo de digestão e absorção de nutrientes enquanto as criptas localizadas na base das vilosidades, possuem células importantes para a renovação celular constante do epitélio (ZHANG & XU, 2006). O funcionamento ideal do intestino delgado está relacionando com vilosidades longas, no entanto, após o desmame há um período de atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas.

Segundo Pluske et al. (1997), a principal causa dessas alterações morfológicas é o consumo de alimento, ou seja, após o desmame, a baixa ingestão energética pode comprometer a morfologia do intestino delgado. Resultados encontrados por García et al. (2016), demonstraram encurtamento das vilosidades de leitões desmamados precocemente aos 14 dias de idade comparado aos leitões desmamados aos 21 dias de idade.

A manutenção do baixo valor de pH no estômago (2,0 - 4,0) é importante para que ocorra a conversão do pepsinogênio em pepsina dando início ao processo da digestão proteica, mas também para evitar a proliferação das bactérias patogênicas (VIOLA & VIEIRA, 2003), que utilizam os substratos proteicos que não são digeridos completamente como substrato para seu desenvolvimento e causam distúrbios fisiológicos como diarreia. Além disso, valores baixos de pH têm efeito bactericida contra microrganismos patogênicos como a *E. coli* (HEO et al., 2013).

Durante a lactação, o leite ingerido possui elevado teor de lactose utilizada por bactérias ácido lácticas como *Lactobacillus* spp, que por fermentação microbiana, produzem ácido láctico capaz de reduzir o pH do estômago (SURYANAYANA et al., 2012). Após o desmame, os leitões passam a consumir uma dieta com menor teor de lactose e ainda são incapazes de manter um baixo valor de pH devido a insuficiente produção de ácido clorídrico pelas células parietais. Assim, a elevação do pH estomacal favorece a proliferação de bactérias patogênicas como *E. coli* e *Salmonella* ssp e a diminuição da digestão e absorção de nutrientes (CHAMONE et al., 2010).

Além disso, o desmame pode estar relacionado com a motilidade gástrica. Segundo Heo et al. (2013), o elevado pH no estômago dos leitões provoca uma redução na taxa de esvaziamento gástrico, contribuindo para a proliferação de bactérias patogênicas associadas a diarreia pós-desmame. De acordo com Martinez et al. (2004), a redução da motilidade gástrica implica no aumento da expressão do gene CRF-r2 (do inglês, *Corticotropin-Releasing Factor Receptor-2*) encontrado no estômago de ratos. No jejuno de leitões desmamados, este gene é regulado positivamente e as mudanças na taxa de esvaziamento gástrico poderiam ser moduladas por um *feedback* intestinal (MOESER et al. 2007).

Os estressores associados ao desmame precoce têm o potencial de alterar os processos normais de desenvolvimento da barreira intestinal, principalmente pelo aumento da permeabilidade. Mediadores relacionados ao estresse, como o CRF (do inglês, *Corticotropin Releasing Factor*) mostrou-se aumentado na circulação de leitões após o desmame, alterando a permeabilidade intestinal (MOESER et al. 2007). O estresse tem papel importante na interação dos mastócitos e a sinalização de receptores de CRF localizados no intestino, provocando disfunções imediatas e de longo prazo na barreira intestinal (MCLAMB et al., 2013).

A barreira intestinal é formada por uma camada de células epiteliais que revestem o trato intestinal e atua como a primeira linha de proteção do organismo contra microrganismos patogênicos e antígenos nocivos presentes no lúmen intestinal (GEWIRTZ et al., 2002). Os danos causados nessa barreira alteram a permeabilidade, permitindo a passagem de agente antigênicos do lúmen para os tecidos subepiteliais resultando em inflamação, baixa absorção e diarreia.

O início da colonização microbiana intestinal se inicia ao nascimento, quando os leitões são expostos há uma grande diversidade de microrganismos, principalmente por aqueles presentes no canal do parto e no ambiente externo (MACH et al., 2015). Durante esse período inicial, a composição e diversidade da microbiota é considerada instável e totalmente influenciada pelas condições ambientais, incluindo o uso de antibióticos, exposição ao estresse e nutrição (SCHOKKER et al., 2014).

Após o desmame, uma nova comunidade microbiana é restabelecida, de maneira que as bactérias ácido lácticas, como os *Lactobacillos* reduzem, enquanto outras bactérias patogênicas como os *E.coli*, aumentam. Isso demonstra que as alterações na composição e atividade da microbiota do TGI após o desmame têm sido sugeridas como um dos fatores que predispõem os animais a infecções patogênicas (HOPWOOD & HAMPSON, 2003).

Ao nascimento, o colostro é a principal fonte de imunoglobulinas para os leitões. Essas imunoglobulinas são absorvidas do intestino para a circulação nas primeiras 48 horas após o nascimento podendo ser observado elevados níveis de imunoglobulinas G (IgG) (SALMON, 1999). Além da IgG, o colostro e o leite materno fornecem imunoglobulinas A (IgA) durante a fase de amamentação.

Após o desmame, a IgA secretora é sintetizada pelo próprio sistema imune adaptativo do leitão. Segundo resultados encontrados por García et al. (2016), houve aumento nas concentrações de IgA no conteúdo intestinal de leitões a partir do vigésimo dia após o desmame, que pode ser explicado pelo desenvolvimento do sistema imunológico e a falta de anticorpos maternos.

O estresse induzido pelo desmame dos leitões pode desencadear o estresse oxidativo pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e diminuição da atividade antioxidantes, contribuindo para distúrbios intestinais (WEI et al., 2017). O dano oxidativo é geralmente associado as altas concentrações de ROS, no entanto, um nível baixo dessas espécies ativa vias de sinalização importantes de proliferação celular e proteção pelo sistema imune (FINKEL, 2003).

O estresse oxidativo é frequentemente correlacionado com o processo inflamatório. O aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 pode reduzir a expressão de proteínas das *tight junctions* e, conseqüentemente, prejudicar a função de barreira (AL-SADI et al., 2009 ; SUZUKI et al., 2011).

De acordo com Xu et al. (2014), existe uma correlação entre microrganismos e estresse oxidativo. Foi relatado que *Lactobacillus* estavam negativamente correlacionados com o estresse oxidativo, mas por outro lado, a *E.coli* apresentou correlação positiva ao estresse oxidativo no intestino de leitões desmamados.

O desenvolvimento do sistema imune da mucosa ocorre simultaneamente com a colonização microbiana intestinal dos leitões recém-nascidos. Estudos demonstraram que a maturação imune é influenciada diretamente pela microbiota que coloniza o intestino no início da vida dos animais (GEUKING et al., 2011; OHNMATCH et al., 2011; LEWIS et al., 2012). De acordo Lewis et al. (2012), a diversidade microbiana do intestino de leitões provavelmente afeta o número de células T efectoras CD4⁺, bem como IgG sérico.

Nos sistemas atuais de criação de suínos, os leitões são constantemente expostos a antibióticos, principalmente para prevenir o desenvolvimento de doenças respiratórias e intestinais. Schokker et al. (2014), avaliaram diferentes condições ambientais após o

nascimento de leitões ainda na maternidade buscando investigar a colonização microbiana e o desenvolvimento imunológico intestinal.

As condições avaliadas foram de leitegadas que não sofreram nenhum tipo de manejo, leitegadas que receberam uma dose de antibiótico no quarto dia após o nascimento e leitegadas que receberam a mesma dose de antibiótico do grupo anterior somado aos manejos iniciais, como pesagem e identificação. Foi observado que os animais que não passaram por nenhum tipo de manejo tenderam a ter maior abundância de *Lactobacillus* comparado aos grupos tratados.

Uma maior abundância de *Lactobacillus* poderia explicar a comunicação entre a microbiota e as células imunológicas do hospedeiro, uma vez que já foi demonstrado que diferentes cepas desses microrganismos podem modular a expressão de vias imunes (VAN BAARLEN; WELLS; KLEEREBEZEN, 2013). Além disso, foi observado que a expressão gênica no íleo de genes relacionados a processos imunológicos foi maior em animais que não passaram por nenhum tipo de manejo comparado aos grupos tratados. Os autores sugerem que regulação negativa nos animais tratados poderia ser devido à alta diversidade microbiana do intestino.

2.3 Características da microbiota dos leitões desmamados

O intestino de mamíferos abriga uma imensa população de microrganismos que desempenham funções biológicas importantes para o hospedeiro. O genoma coletivo da população desses microrganismos é estimado em um total de três milhões de genes (QIN et al., 2010), por outro lado, o genoma humano contém cerca de 23.000 genes (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004) o que configura uma imensa diversidade genética da microbiota no trato gastrointestinal.

A relação mutual existente entre os microrganismos e o hospedeiro é caracterizada pela contribuição da microbiota em processos fisiológicos para o animal em troca de um ambiente favorável e obtenção de nutrientes para a sobrevivência dessa população (KAMADA et al., 2013). As maiores contribuições estão relacionadas a digestão e fermentação de carboidratos, produção de vitaminas, diferenciação do epitélio e manutenção da barreira intestinal, assim como o desenvolvimento do sistema imunológico do animal (GRESSE et al., 2017).

A composição da microbiota intestinal se tornou alvo de inúmeras pesquisas que buscam compreender melhor a função dessa população de microrganismos na saúde animal. Segundo Palmer et al. (2007), essa composição não é considerada estática e se altera ao longo do tempo

através de uma sucessão de microrganismos que finaliza em uma comunidade clímax, mais estável.

De acordo com Isaacson & Kim (2012), mesmo após o estabelecimento da comunidade clímax, ocorrem mudanças contínuas na composição da microbiota em resposta aos microrganismos presentes em diferentes ambientes, doenças e estresse, bem como a composição nutricional da dieta. Além disso, a colonização no início da vida fornece condições favoráveis à colonização subsequente através de um ambiente adequado, produção de substratos e proteção (HOUGHTLING & WALKER, 2015).

Kim et al. (2011), descreveram a diversidade microbiana das fezes de suínos de granjas comerciais ao longo do tempo, num período de 10 semanas de idade até 22 semanas e observaram que as alterações na composição da microbiota permanecem até aproximadamente as 22 semanas de idade. Cinco principais filos foram identificados, incluindo *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, independentemente da idade. O gênero *Prevotella* representa cerca de 30% às 10 semanas de idade, reduzindo para aproximadamente 4% quando os animais atingem 22 semanas. Ao mesmo tempo, com a diminuição de *Prevotella*, há um aumento do gênero *Anaerobacter*.

Nos suínos, a colonização do trato gastrointestinal inicia ao nascimento, quando os leitões são expostos a uma enorme variedade de microrganismos presentes desde o canal do parto até o ambiente em que nascem. Enquanto permanecem com a fêmea no período de amamentação, os leitões estão em constante contato com as fezes, pele e mucosa da porca que representa um papel importante nesse processo de colonização inicial (THOMPSON et al., 2008).

Inicialmente, a colonização por *E.coli* e *Streptococcus* spp. proporciona um ambiente anaeróbico favorável para a colonização subsequente de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (PETRI et al., 2010). De acordo com resultados encontrados por Mach et al. (2015), 45% do total de clones avaliados por sequenciamento genético de amostras do conteúdo ileal de leitões recém-nascidos continham sequências relacionadas a *E. coli* e *Shigella flexneri*.

É relatado que o leite tem grande influência sobre a composição da microbiota intestinal, especialmente para alguns microrganismos. De acordo com Frese et al. (2015), o leite demonstra um papel seletivo importante para alguns microrganismos intestinais e conhecer quais populações microbianas são influenciadas pelo leite até o desmame, fornece informações sobre como mudanças nutricionais pode modular essa microbiota.

Segundo Zivicovic et al. (2013), há uma hipótese de que os glicanos secretados no leite humano têm um efeito controlador da microbiota de bebês que estão amamentando, entendido como “microbioma orientado pelo leite”. Os glicanos encontrados no leite humano são estruturalmente semelhantes ao leite da fêmea suína.

Resultados encontrados por Frese et al. (2015), sugerem uma população de microrganismos dominantes cuja composição principal permaneceu estável do nascimento até as três semanas de vida dos leitões. Durante esse período, essa população era abundante em *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae* e *Enterobacteriaceae*. Logo, esse período de amamentação pode ser dominado por um “microbioma orientado pelo leite”.

Ainda, de acordo com os resultados de Frese et al. (2015), ao comparar a microbiota das fezes de leitões na maternidade com as de leitões desmamados, foram encontradas diferenças significativas para a família *Prevotellaceae*. Houve um aumento dessa população de 0,3% em leitões na maternidade para 14,8% em leitões desmamados. Concomitantemente, houve diminuição na população de *Bacteroidaceae* de 15,4% em animais na maternidade para 1,4% em leitões desmamados.

Ao avaliarem a comunidade bacteriana fecal de leitões no período de transição para o desmame, Pajarillo et al. (2014), relataram que antes do desmame, os filos predominantes nas amostras fecais eram *Firmicutes* (54,0%), *Bacteroidetes* (38,7%) e *Proteobacteria* (4,2%) em comparação os filos encontrados pós-desmame representados por *Bacteroidetes* (59,6%), *Firmicutes* (35,8%) e *Spirochaetes* (2,0%). Ambos os períodos compartilharam filos semelhantes, onde *Bacteroidetes* e *Firmicutes* representaram mais de 90% do total.

Em relação ao gênero, *Bacteroides*, *Blautia*, *Dorea*, *E.coli* e *Fusobacterium* são os mais abundantes antes do desmame em comparação ao período pós-desmame onde *Prevotella* e *Clostridium* predominam. Considera-se que a numerosa presença de *Bacteroides* antes do desmame está relacionada a habilidade em utilizar monossacarídeos e oligossacarídeos presentes no leite da porca, enquanto que a maior presença de *Prevotella* pós-desmame está relacionada com a degradação de hemicelulose presente nas rações.

O desmame é um evento importante para os leitões e é um desafio para o seu desenvolvimento a partir do momento em que são submetidos às adaptações nutricionais, imunológicas e psicológicas (HU et al. 2014) podendo resultar em alterações drásticas da microbiota do trato gastrointestinal, refletindo em falta de apetite, menor consumo de ração e queda no desempenho (ISAACSON & KIM, 2012).

É caracterizado que a fermentação por microrganismos no TGI é essencial para o suíno. Como produto dessa fermentação de componentes da dieta que não foram absorvidos no intestino delgado, os ácidos graxos voláteis (AGV) atuam na absorção de água e Na⁺, controla o pH e, por consequência, ocorre a inibição de patógenos. A fermentação de carboidratos produz AGV principalmente de cadeia linear como ácidos acético, propiônico e butírico (LALLÈS et al.,2007b). O butirato fornece energia para as células epiteliais e é preferencialmente metabolizado pelos colonócitos (WILLIANS et al., 2001).

A alteração do equilíbrio da microbiota intestinal é conhecida como disbiose e é um fator importante no desencadeamento de distúrbios intestinais como a diarreia, associados a presença de patógenos específicos como a *E.coli*, *Clostridium perfringens* e *Brachyspira* (COSTA et al.,2014; MINAMOTO et al.,2014; WARD et al.,2016).

A diarreia acomete os leitões nas primeiras semanas pós-desmame e pode ser responsável por grandes perdas econômicas no sistema de produção. De acordo com Gresse et al., (2017), diferentes estudos realizados durante a transição do desmame demonstraram redução nas bactérias do grupo *Lactobacillus*, enquanto o *Clostridium* spp., *Prevotella* spp. e *E. coli*, foram impactados positivamente. Os *Lactobacillus* spp. são conhecidos pelo seu papel em prevenir a colonização de patógenos por mecanismo de competição por nutrientes e sítios de ligação, produção de antimicrobianos como bacteriocinas e ácido lático (HAMMES et al., 2006).

Entre os patógenos causadores de diarreia pós-desmame, a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é o principal agente infeccioso responsável pela mortalidade de leitões nas primeiras semanas após o desmame. A diarreia é considerada uma das doenças que mais afetam a economia do sistema de produção (MALKEBEEK et al., 2013). Os fatores de virulência da *ETEC* estão relacionados a adesão às microvilosidades dos enterócitos no intestino delgado e a produção de enterotoxinas que induzem alterações funcionais das células (NAGY & FEKET, 1999).

A adesão ocorre através de adesinas fimbriais e as mais comumente encontradas são as do tipo F4 (previamente conhecida como K88) e F18 (LUPPI et al., 2016). A colonização por *ETEC* em suínos é mediada por receptores específicos para essas fímbrias, desta forma, a presença e funcionalidade desses receptores são fundamentais para determinar a predisposição dos suínos a infecção por *ETEC*. O grau de expressão dos genes desses receptores está relacionado à idade do animal (NAGY & FEKET, 2005).

Os receptores para o F18 são expressos em leitões a partir dos dez dias de idade, aumentando gradativamente e mantendo alta expressão na terceira semana de vida, coincidindo com o período do desmame (CODDENS et al., 2007). Segundo Zimmermann et al. (2010), receptores para F4 são expressos nos enterócitos do nascimento a idade adulta, tornando os suínos de todas as idades susceptíveis à infecção.

Após a adesão, enterotoxinas são produzidas pela bactéria que são capazes de alterar o balanço eletrolítico do intestino delgado. As principais enterotoxinas encontradas são a termolábil (LT) e termoestável (ST) que são divididas em duas classes STa e STb. As toxinas LT possuem uma boa capacidade antigênica comparadas as toxinas ST (NAGY & FEKET, 2005). Ainda de acordo com os mesmos autores, o mecanismo básico de ação dessas toxinas resulta em alterações nas células do intestino delgado, provocando um aumento da secreção de água, Na⁺ e Cl⁻ e, ao mesmo tempo, uma diminuição na absorção de líquido.

Os antibióticos na alimentação de leitões durante a fase de creche são frequentemente usados para aliviar os danos causados pela diarreia nesse período. Esses antimicrobianos têm diferentes propósitos, não só para o tratamento de doenças, mas, como melhoradores de desempenho para animais. Diferentes sintomas clínicos sugerem o uso de antibióticos na saúde humana e animal. Seja qual for o alvo da infecção, a microbiota intestinal será afetada com redução nas populações bacterianas (RASHID et al., 2012).

Segundo Allen et al. (2014), consequências não desejadas com o uso de antibióticos incluem a seleção de genes de resistência bacteriana, transferência de genes entre cepas bacterianas, aumento da população entérica através da composição alterada de carboidratos, e alterações da resposta imune. Dessa forma, entender como uma microbiota intestinal reage e se recupera da desordem provocada pelos antibióticos é fundamental para que se possa modulá-la.

A exemplo desses antimicrobianos, a colistina pertence à classe de antibióticos polimixinas que possui atuação contra diferentes bactérias Gram-negativas, especialmente as entéricas (FRANCESCHINA et al., 2019). O sulfato de colistina, também conhecido como polimixina E foi utilizada contra as diarreias em leitões no pós-desmame, para fins terapêuticos, de forma preventiva, bem como melhorador de desempenho.

Segundo Liu et al. (2016), a China é o país que lidera o uso da colistina na produção animal seja para uso terapêutico ou como melhorador de desempenho. No entanto, a descoberta da existência de um gene que confere resistência à *E. coli* contra colistina, provocou restrições quanto ao uso na produção animal. No Brasil, o MAPA lançou a Instrução Normativa nº 45,

que proíbe o uso do sulfato de colistina como aditivo melhorador de desempenho, podendo ainda ser utilizada para o uso terapêutico (BRASIL, 2016).

Nas fases de crescimento e terminação, os antibióticos representam uma ferramenta importante em melhorar o desempenho dos animais quando utilizando em doses sub-terapêuticas. A tilosina foi frequentemente utilizada em rações de suínos nessas fases (MECEWEN & FEDORKA-CRAY, 2002). O efeito em melhorar o desempenho dos animais é provavelmente baseado nas mudanças que ocorrem na microbiota intestinal, uma vez que, os primeiros estudos demonstraram ineficácia dos antibióticos em promover o crescimento quando administrados a animais *germ-free* (COATES et al., 1963).

Kim et al., (2012) avaliaram o efeito promotor da tilosina para suínos em fase de crescimento sobre o microbioma fecal. Não foram encontradas diferenças significativas no nível do filo, porém, houve diferenças estatísticas quando medidos no nível do gênero. Os gêneros *Lactobacillus*, *Sporacetigenium*, *Acetanaerobacterium* e *Eggerthella* foram mais predominantes nos animais tratados com tilosina. Uma relação positiva entre o aumento de *Lactobacillus* spp. e um aumento no ganho de peso foram mostrados em outros modelos animais (DUMONCEAUX et al., 2006; LIN, 2011).

A compreensão da grande maioria das bactérias intestinais é limitada, apesar de que algumas bactérias intestinais cultiváveis tenham sido estudadas por muitos anos. A tecnologia de sequenciamento possibilitou a identificação de bactérias que podem ser cultivadas e ainda são pouco exploradas, definindo padrões comuns na composição microbiana (ALLEN et al., 2014).

Desenvolver estratégias alternativas aos antibióticos para reestabelecer o equilíbrio da microbiota e controlar infecções gastrointestinais, buscando um determinado alvo bacteriano, pode ser uma maneira de reduzir ou eliminar os efeitos colaterais.

Diferentes alternativas aos antibióticos na produção animal são descritas na literatura (CHENG et al., 2014; WANG et al., 2016). Existem diferentes abordagens com o objetivo de reduzir os genes de resistência da bactéria ou substituir os antibióticos. Essas substituições envolvem compostos naturais que podem ter como alvo bactérias específicas, e dessa forma, é possível evitar diretamente a resistência de outras bactérias.

Em suínos, os aditivos alimentares são utilizados como estratégias preventivas no controle da diarreia pós-desmame ou ainda como melhoradores de desempenho durante as fases de produção. Como alternativa promissora, os óleos essenciais são definidos como um complexo de componentes orgânicos voláteis obtidos de diferentes plantas com propriedades

antimicrobianas (ZENG et al., 2015a). Em pesquisas com leitões, a suplementação com óleos essenciais é associada principalmente com o aumento de *Lactobacillus* e redução da *E. coli* (LI et al., 2012; ZENG et al., 2015b; WEI et al., 2017).

Os resultados encontrados por Li et al. (2012) para contagem de *E. coli* foram semelhantes ao comparar a administração de óleos essenciais e antibióticos para leitões desmamados. Em amostras coletadas do intestino grosso, houve redução desse microrganismo. Assim, os aditivos alternativos como os óleos essenciais podem ser considerados promissores na substituição aos antibióticos visando a manutenção de uma microbiota benéfica aos animais.

2.4 Resposta imunológica de leitões desmamados

No momento em que os leitões são desmamados precocemente, são considerados imaturos em suas respostas fisiológicas digestivas e imunológicas. As primeiras 12 semanas após o nascimento são consideradas importantes no processo de amadurecimento do trato gastrointestinal. As funções relacionadas ao epitélio gastrointestinal e imunológico sofrem diversas alterações enquanto os leitões se adaptam ao novo ambiente (MOESER et al., 2017).

Devido à natureza epiteliocorial da placenta suína, o suporte imunitário para os leitões ocorre após o nascimento através das imunoglobulinas presente no colostro e no leite (ROOKE & BLAND, 2002). Após o nascimento, os enterócitos do intestino do leitão atuam de forma não seletiva num curto período de tempo de 24 a 48 horas como uma estratégia extremamente importante para a absorção das imunoglobulinas (STOKES et al., 2004). O intestino do leitão nesse período pode absorver essas macromoléculas em grandes quantidades, resultando em um número de anticorpos séricos semelhante ao da porca (PLUSKE et al, 2003).

Quando a lactação se estabelece, a concentração das imunoglobulinas se altera, ou seja, há uma menor concentração total de imunoglobulinas e uma alteração na concentração relativa (SALMON, 1999). A concentração da imunoglobulina G (IgG) que era predominantemente presente no colostro em comparação a imunoglobulina A (IgA) reduz, enquanto há um aumento na concentração da IgA no leite conferindo proteção das mucosas (ROOKE & BLAND, 2002). A proteção imunológica passiva se estende por todo o período de lactação, e o momento do desmame representa uma mudança significativa na proteção imunológica do leitão.

O epitélio intestinal representa uma conexão importante entre o sistema imunológico do leitão e o ambiente luminal. O intestino deve conferir uma barreira protetora aos elementos patogênicos e antigênicos provenientes do ambiente luminal que contém uma enorme quantidade de toxinas, patógenos e componentes da dieta capazes de provocar uma resposta

imunológica exacerbada (MOESER et al., 2017). Ao mesmo tempo, realiza funções importantes como digestão e absorção de nutrientes, secreção e absorção de água e eletrólitos (WIJTEN et al., 2011).

A barreira intestinal é regulada por um conjunto de proteínas de membrana denominado *tight junctions* que regulam a permeabilidade epitelial. Para o funcionamento adequado da barreira, o epitélio deve apresentar um grau de permeabilidade normal tanto paracelular quanto transcelular (TURNER et al., 1997).

O momento do desmame está associado a fatores de estresse que representa uma ameaça à integridade e funcionalidade da barreira, uma vez que o aumento da permeabilidade favorece a translocação de bactérias, toxinas e antígenos presentes no lúmen iniciando respostas inflamatórias que desencadeiam distúrbios intestinais (BLIKSLAGER et al., 2007).

O peptídeo semelhante ao glucagon-2 (GLP-2), um hormônio gastrointestinal de ação trófica, é importante por atenuar os danos a barreira epitelial intestinal. De acordo com Cameron et al. (2005), o GLP-2 pode reduzir significativamente os fluxos intestinais de Na⁺, translocação de antígenos e, sob condições de estresse, esse hormônio efetivamente melhora a função de barreira e reduz a quantidade de antígeno luminal que atravessa a lâmina própria. Segundo Chen et al. (2008), a recuperação da integridade da barreira intestinal se dá pelo aumento da expressão de zônula oclusiva-1 (ZO-1), claudina-1 e ocludina.

Entre as proteínas de membrana, a ocludina e claudina-1 são as mais importantes e críticas na organização estrutural e funcional das *tight junctions*. A ocludina é apontada como a primeira proteína de membrana integral e tem funções importantes na manutenção da integridade e função de barreira (YU et al., 2014).

Estruturalmente, a barreira intestinal é composta por células epiteliais especializadas como as células caliciformes que secretam muco, formando uma camada protetora juntamente com as células de Paneth, que secretam peptídeos antimicrobianos (MOESER et al., 2017). As células epiteliais sofrem constantes renovações ao longo do eixo vilo-cripta. As células maduras localizadas no ápice das vilosidades se originam de células estaminais multipotentes encontradas na base da cripta (YANG et al., 2016).

O *turn over* celular em condições normais ocorre de forma ordenada aproximadamente entre cinco e sete dias (FUKATSU & KUDSK., 2011). No entanto, resultados encontrados por Hu et al. (2013), demonstram que a altura das vilosidades e a profundidade da cripta recuperam os valores semelhantes ao período pré-desmame aproximadamente 14 dias após o desmame dos leitões.

A camada presente entre o lúmen intestinal e as vilosidades é preenchida por um muco composto por micro-proteínas na forma de mucina responsável por criar uma barreira física neste local. A mucina apresenta elevadas concentrações de defensinas e outras moléculas antibacterianas, como lactoferrina, lisozimas. Em situações de estresse como ocorre no período do desmame, a redução dessa camada somada a maior permeabilidade da mucosa favorece a invasão bacteriana (FUKATSU & KUDSK., 2011).

Adicionalmente aos componentes físicos e químicos da barreira, o componente imunológico é representado pelo tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), o maior órgão linfoide composto por tecidos linfáticos organizados como as células epiteliais intestinais, placas de Payer, linfonodos mesentéricos, linfonodos intraepiteliais que são importantes por serem o sítio primário de exposição ao antígeno (RUTH & FIELD, 2013).

Na lâmina própria, situada logo abaixo da membrana das vilosidades intestinais, estão presentes a maioria dos componentes do sistema imunológico com grande número de células B, plasmócitos, macrófagos, células dendríticas e células T CD4+ e CD8+ (SOLANO-AGUILAR et al., 2001).

A função da barreira intestinal também é influenciada pela regulação de citocinas inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias exercem influência na integridade intestinal e na função epitelial (CAMPBELL, 2013). O aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias no intestino está relacionada com infecções entéricas em leitões recém desmamados. Ainda, a produção exacerbada dessas citocinas podem influenciar negativamente a integridade intestinal e a função epitelial (LIU et al., 2008).

Segundo Piè et al. (2004), ao avaliarem a expressão gênica de citocinas em leitões desmamados aos 28 dias de idade, observaram que ocorre um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-6 especialmente na primeira semana após o desmame. Estudos têm demonstrado que os níveis elevados de TNF- α e o Interferon- γ (IFN- γ) podem perturbar a barreira intestinal.

Em menores concentrações, essas citocinas podem atuar sinergicamente e comprometer a função de barreira (WANG et al., 2005). Durante uma infecção, as citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , desempenham um papel fundamental na elaboração de uma resposta imune. Porém, a produção exagerada dessas citocinas teria efeitos prejudiciais sobre o crescimento e a saúde dos animais (SPURLOCK, 1997).

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*), desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio entre os citocinas pró e anti-inflamatórias (HOWE et al., 2005). O TGF- β por exemplo, é capaz de reparar o dano epitelial após uma lesão através do aumento da migração de células epiteliais e diminuição da permeabilidade epitelial paracelular (BLINKSLAGER et al. 2007).

Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é uma citocina com elevadas propriedades anti-inflamatórias, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, além de regular negativamente os receptores de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2007). Desse modo, o aumento da função imunológica de leitões desmamados e a modulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias podem ser benéficos para promover a saúde animal e minimizar a incidência de doença.

2.5 Uso de antibióticos na produção de suínos

A descoberta dos antibióticos na metade do século XIX, chamada de “a idade do ouro” marcou o início da descoberta de várias classes de antibióticos e comercialização dos medicamentos contra microrganismos. No entanto, nas últimas décadas a descoberta de novas classes reduziu completamente.

De acordo com Spellberg (2012), não houve nenhuma classe nova de antibióticos contra bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Salmonella* entérica em mais de 40 anos. Descobrir novos antibióticos se tornou um desafio para a indústria, uma vez que as atuais abordagens de descoberta demandam tecnologias especializadas e visam alvos moleculares específicos (SHARMA & TOWSE, 2010; SILVER, 2011).

De acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), no ano de 2017, o mercado brasileiro movimentou R\$5,34 bilhões em produtos para a saúde animal. Desse total, a suinocultura representou 10,9%, se mantendo estável em relação ao ano anterior. No mercado global, os fármacos tradicionais, incluindo antibióticos e antiparasitários reduziram sua participação de 62% no ano de 2013 para aproximadamente 57% no ano de 2017. No entanto, as vacinas e os aditivos aumentaram sua participação de 26% para 29% e 12% para 14%, respectivamente, considerando o mesmo período.

Na produção animal, os antibióticos representam uma ferramenta importante. Como melhoradores de desempenho, são utilizados em doses sub-terapêuticas, por longos períodos e a

principal forma de ação é relacionada com a redução de infecções subclínicas. Semelhante à medicação preventiva, os antibióticos também são utilizados na forma de “pulsos” com doses terapêuticas durante um curto período de tempo. Como exemplo, essa prática pode ser utilizada no período pós-desmame contra infecção por *E. coli*, uma vez que os leitões têm dificuldades em controlar as doenças causadas por esse microrganismo.

Outro tipo de utilização é feito nos primeiros dias após os animais serem transferidos para a fase de crescimento e terminação, pois os animais passam por um estresse no momento dessa mudança, seja pelo transporte, pelas condições das instalações ou pela mistura de animais (BARCELLOS et al., 2009).

A ação benéfica dos antibióticos na suinocultura está associada a manutenção da eubiose intestinal, favorecendo a digestibilidade dos nutrientes. O principal mecanismo de ação sugerido é a redução de microrganismos patogênicos e o favorecimento de cepas desejáveis (SILVA, 2014).

Essa ação é bastante relevante em ambientes desfavoráveis e contaminados, assim a atuação dos antibióticos é inversamente relacionada a condição sanitária do ambiente. A exposição frequente dos suínos a um ambiente adverso, favorece a proliferação de microrganismos patogênicos causadores de doenças. O fornecimento de antibióticos reduz a carga patogênica e permite ao animal expressar o seu máximo desempenho (GAVIOLI, 2012).

Contudo, de acordo com Morés (2014), o aumento de bactérias resistentes ao uso indiscriminado dos antibióticos e a potencial implicação na saúde humana, criaram muitas discussões com relação a essa prática no mundo. O principal problema relacionado ao uso de antibióticos na produção animal é que muitos deles são utilizados no tratamento de infecções bacterianas em humanos.

Assim, o uso de um antibiótico específico como melhorador de desempenho também pode levar à resistência cruzada com antibióticos usados na medicina. No ano de 1975 foi documentada a transferência de resistência para o homem através da alimentação. A oxitetraciclina utilizada como melhorador de desempenho para frangos resultou em um aumento de *E. coli* resistente a tetraciclina. Também foi observado a mesma resistência no trato gastrointestinal das pessoas que habitavam, manejavam e se alimentavam dessas aves (ROLAIN, 2013).

Segundo Looft et al. (2012), ao avaliarem a microbiota intestinal de leitões desmamados que receberam clortetraciclina, sulfametazina e penicilina via dieta, comparada ao grupo que não recebeu medicamento, observaram aumento de genes de resistência a antibiótico, incluindo

aqueles que não foram administrados, sugerindo os potenciais efeitos da seleção direta e indireta de resistência a antibióticos.

Um antibiótico considerado ideal deve ser prejudicial apenas para o patógeno e não para o hospedeiro. Essa propriedade seletiva está relacionada a receptores específicos ou a inibição de processos bioquímicos essenciais para o microrganismo (SEFTON, 2002). Ainda de acordo com o mesmo autor, os principais mecanismos de ação dos antibióticos são: inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de ácidos nucleicos, dano à membrana plasmática e inibição da síntese de metabólitos essenciais.

Os mecanismos de resistência a antibiótico intrínseco das bactérias são complexos e definidos por adaptações evolutivas. É um fenômeno natural para a proteção das bactérias de compostos antimicrobianos produzidos por elas mesmas e para aumentar a taxa de sobrevivência em ambientes competitivos (D'COSTA et al., 2011). É uma particularidade genética codificada no cromossoma do DNA.

De acordo com Rivera Calderón et al. (2012), a resistência de forma adquirida acontece quando há uma alteração no DNA da bactéria, expressando um novo perfil fenotípico. Nos estudos utilizando a metagenômica foi possível observar que a microbiota intestinal humana nativa contém diferentes genes de resistência que podem ser passados para bactérias potencialmente patogênicas presentes no intestino (SCOTT, 2002 ; SALYERS et al., 2004 ; KAZIMIERCZAK & SCOTT, 2007).

Segundo Tang et al. (2017), não há uma concordância sobre o efeito do uso de antibióticos na produção animal e a resistência a antibióticos na população humana. Além disso, as consequências das intervenções que limitam o uso de antibióticos na produção animal sobre a resistência aos antibióticos em animais e humanos é ainda incerto.

Em 2006, a União Europeia proibiu o uso de todos os antibióticos melhoradores de desempenho, de acordo com o Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho EC nº 1831/2003. Tal proibição provocou impactos negativos na produção animal, como redução da produção e o aumento na quantidade total de uso de antibióticos em doses terapêuticas em consequência da alta incidência de doenças (CHENG et al., 2014).

Nos Estados Unidos em dezembro de 2016, a FDA (*Food and Drug Administration*) restringiu o uso de antibióticos considerados medicamento importantes para a saúde humana apenas para o tratamento e prevenção de doenças em animais. Em 2014, a *Health Canada* publicou um plano de ação para a eliminação progressiva dos antibióticos importantes na medicina como melhoradores de desempenho.

No Brasil, as restrições aos antibióticos como melhoradores de desempenho iniciaram em 1998 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) banindo o uso de anfenicóis, tetraciclinas, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas como melhoradores de desempenho para animais. Ao longo dos anos, outras restrições foram feitas. Em 2016, foi publicada uma Instrução Normativa nº 45 vetando o uso da Colistina (polimixina E) como melhorador de desempenho (BRASIL,2016).

No mesmo ano, pesquisadores do Instituto de Ciências Biomédica (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) identificaram o gene *mobilized colistin resistance* (mcr-1) em cepas de *E. coli* isoladas de animais de produção. O gene é responsável pela resistência bacteriana a uma classe de antibióticos utilizados justamente para tratar infecções por bactérias multirresistentes (FERNANDES et al, 2016),

Também foi relatado pelos pesquisadores o primeiro caso de infecção humana no país por uma cepa bacteriana portadora do gene e resistente à colistina, considerada como último recurso no tratamento de infecções que não respondem a outros medicamentos (FERNANDES et al., 2016)

Mais recentemente em dezembro de 2018, a secretaria de Defesa Agropecuária ligada ao MAPA publicou a Portaria nº 171 proibindo o uso dos antimicrobianos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos. Ainda de acordo com a portaria, esse antimicrobianos são considerados importantes para a medicina humana.

Um bom controle sanitário e um programa de biossegurança adequados do sistema de produção ainda são ferramenta importantes que auxiliam na redução do uso de antibióticos (BEZERRA et al., 2017).

Contudo, diante deste cenário de restrição ao uso dos antibióticos como melhoradores de desempenho, é essencial desenvolver alternativas. De maneira geral, espera-se que os aditivos alternativos sejam capazes de controlar distúrbios intestinais, melhorar a imunidade do animal e a função intestinal sem que aja o comprometimento da produção, que não represente riscos à saúde pública e que sejam economicamente viáveis. Todos esses fatores indicam a complexidade em desenvolver alternativas viáveis e, por isso, acredita-se que uma única alternativa não seja capaz de substituir os antibióticos na alimentação animal (GONG et al 2014; VALENZUELA-GRIJALVA et al., 2017).

2.6 Óleos essenciais

O uso terapêutico de plantas e extratos vegetais é um recurso milenar utilizado pelo homem para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos. O conhecimento desenvolvido sobre o assunto foi feito de maneira empírica ao longo dos anos, dando origem aos sistemas de medicina tradicional (ALLEN, 2012).

Embora a medicina moderna esteja bastante desenvolvida na maior parte do mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2006, cerca de 85% da população de países em desenvolvimento usaram de plantas medicinais ou preparações dessas para os cuidados básicos de saúde.

As primeiras pesquisas científicas com plantas medicinais foram realizadas no século XIX, com o isolamento de alguns compostos que se caracterizaram como princípios ativos e eficazes para a medicina (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991). No entanto, a continuidade dessas pesquisas e o uso de espécies vegetais pela população brasileira foi freada devido ao processo crescente da industrialização farmacêutica e uso das drogas sintéticas (BRUNING; MOSEGUI; VIANA, 2012).

De acordo com Rocha et al. (2015), apesar da ampla aceitação das drogas sintéticas, houve uma ascensão no uso de plantas bioativas nas áreas urbanas ainda na segunda metade do século XX. Essa ascensão se deve a presença de estabelecimentos comerciais especializados na venda de produtos naturais nos centros urbanos, feiras livres e veiculação cada vez mais frequente de informações relacionadas aos tratamentos alternativos (LUZ, 2005).

Segundo dados da IMS *Health*, do total faturado pela indústria de fármacos no ano de 2015, os produtos fitoterápicos representaram 2% do faturamento global, movimentando R\$1,6 bilhões. Esse mercado pode ser considerado em expansão, principalmente no Brasil, já que o país possui a maior biodiversidade do planeta com aproximadamente 20% do número total das espécies de flora (BRASIL, 2018).

Os grupos de princípios ativos que compõe as plantas medicinais podem ser classificados de acordo com suas propriedades físicas, químicas ou atividade biológica e são representados principalmente por: compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e óleos essenciais (LUCHESE, 2009).

Aproximadamente três mil óleos essenciais são conhecidos, dos quais cerca de 10% são comercialmente importantes e usados principalmente para o mercado de fragrâncias, cosméticos, flavorizantes de alimentos, medicina e produtos de limpeza (VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1999). Embora representem o grupo de extratos vegetais mais pesquisados na

produção animal, os óleos essenciais são considerados como uma nova classe de aditivos comparado a outras alternativas como ácidos orgânicos, probióticos e prebióticos (ZENG, 2015a).

Os óleos essenciais se originam das plantas que são conhecidas por sintetizarem um número aproximado de 200.000 metabólitos secundários, sendo que dentre estes, os compostos aromáticos constituem um importante grupo e compreende principalmente os terpenóides, fenilpropanóides, indol e compostos sulfurados (SHARMA et al. 2013).

Tais substâncias constituem-se como um extenso grupo de moléculas orgânicas produzidas como mecanismo de defesa, evitando injúrias causadas por fatores externos (CORREIA et al., 2008; VIEGAS JÚNIOR, 2003). Dessa forma, os terpenos apresentam reconhecida atividade antimicrobiana. O princípio ativo dos óleos essenciais está relacionado às substâncias encontradas em maior concentração (DE MARTINO et al., 2015; LUTFI & ROQUE, 2014).

Os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas estão relacionados ao seu mecanismo de defesa natural, e de acordo com Gobbo-Neto & Lopes (2007) podem ser influenciados dentre vários fatores, pela sazonalidade, estágio de desenvolvimento e idade da planta, temperatura, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes do solo e altitude. Além disto, estes compostos ativos podem ser sintetizados em vários órgãos dos vegetais, tais como flores, folhas, frutos, caule e raiz. (ANDRADE et al. 2014).

Assim, considerando esses compostos, destacam-se os valores de 85% da composição química de carvacrol no óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (GUARDA et al. (2011); 67,58% de cinamaldeído em canela (*Cinnamon zeylanicum*) (FENIMAN et al. 2012); 99,6% de eugenol e acetato de eugenol no cravo da índia (*Syzygium aromaticus*) (MORITZ et al. 2012) e 48,9% de timol no tomilho (NIKOLIĆ et al. 2014).

De acordo com Silva et al. (2010), é possível observar um efeito sinérgico entre os componentes primários e componentes encontrados em menor concentração que atuariam como potencializadores dos compostos primários. Segundo os autores, o óleo essencial de orégano com menor teor de carvacrol (61,7%), mas combinado com o ρ -cimeno e o γ -terpineno apresentou maiores halos de inibição comparado ao mesmo óleo em maior concentração (93,4%) sem a presença de ρ -cimeno e o γ -terpineno. Esses hidrocarbonetos facilitam a passagem do carvacrol através da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana.

Segundo Zhai et al. (2018), os óleos essenciais representam menos de 1% do peso úmido da planta, sendo necessário ampliar esse rendimento através das pesquisas em áreas como o

melhoramento genético e métodos de extração. Os métodos mais conhecidos para a obtenção dos óleos são por fermentação ou, mais comumente, por destilação a vapor (VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999).

Nesse sentido, o conhecimento das atividades biológicas dos óleos essenciais se torna desafiador. De acordo com Bouhaddouda et al. (2016), o óleo essencial extraído do orégano (*Origanum vulgare*) por destilação a vapor possui uma grande atividade antibacteriana e uma moderada atividade antioxidante, no entanto, o extrato metanólico possui uma alta atividade antioxidante e nenhuma atividade antibacteriana. Isso sugere que, a atividade biológica também é baseada no método de extração (VIGAN, 2010).

Devido as propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, os óleos essenciais são amplamente utilizados na saúde humana e surgem como uma possível alternativa na substituição dos antibióticos melhoradores de desempenho na produção animal, sendo essa aplicação direcionada para os efeitos antimicrobiano dos óleos (OMONIJO et al., 2018). Além disso, foram observados efeitos positivos sobre o crescimento e saúde dos animais (PUVAČA et al., 2013), incluindo melhora na digestibilidade e saúde intestinal (CHITPRASERT & SUTAPHANIT, 2014) e imunidade (BRENES & ROURA, 2010).

De acordo com Michiels (2009), os óleos essenciais mais utilizados na produção animal são carvacrol, timol, cinamaldeído, citral e eugenol. Entre os compostos, o carvacrol e o timol apresentam grande probabilidade de substituir os antibióticos. O carvacrol é considerado mais efetivo, pois atua em leveduras, fungos e microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (ABBASZADEH et al., 2014). A estrutura do timol é bastante semelhante ao do carvacrol se diferenciando apenas no grupo hidroxila e em sua localização no anel fenólico (ULTEE et al., 2002).

Os óleos essenciais têm sido alvo de inúmeras pesquisas e têm demonstrado resultados promissores em dietas para animais (MUELLER et al., 2012, AKBARIAN et al., 2014, PLACHA et al., 2014, TAN et al., 2015, ZOU et al., 2016, LIU et al., 2017). Além do que, a maioria dos óleos essenciais são classificados como Geralmente Reconhecidos como Seguros (*Generally Recognized as Safe, GRAS*) pela *Food and Drug Administration* (FDA, USA 2018).

2.6.1 Mecanismos de ação

Os óleos essenciais são considerados compostos naturais, pouco tóxicos e livres de resíduos quando comparados aos antibióticos (GONG et al., 2014). Segundo Kohlert et al.,

(2000), os princípios ativos dos óleos essenciais são absorvidos no intestino, rapidamente metabolizados pelos enterócitos, biotransformados no fígado e posteriormente excretados pela urina e respiração (CO₂). A rápida metabolização diminui o risco de acúmulo nos tecidos, quando comparados com os antibióticos melhoradores de desempenho (BHAT & CHANDRASEKHARA, 1986).

Dentre os possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais no organismo animal, são considerados controle de patógenos pela atividade antimicrobiana, melhora na digestão e absorção de nutrientes pelo estímulo da atividade enzimática, atividade antioxidante, modificações na histologia no epitélio intestinal e imunomodulação (BRUGALLI, 2003).

De acordo com as diferentes composições dos óleos essenciais, a atividade antimicrobiana provavelmente não é conferida a um único mecanismo específico, e sim que existem vários alvos na célula bacteriana (SKANDAMIS et al., 2001; CARSON et al., 2002). O principal mecanismo pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antimicrobiano é atuando na estrutura celular das bactérias. Um mecanismo bem elucidado está ligado a característica hidrofóbica dos óleos, que perturba a permeabilidade das membrana celular e a homeostase pela perda de componentes celulares, influxo de outras substâncias ou mesmo morte celular (O'BRYAN et al., 2015).

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular constituída principalmente por peptidoglicanos ligados a outras moléculas, como proteínas. No entanto, as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular contendo lipopolissacarídeos hidrofílicos, que se torna uma barreira contra compostos hidrofóbicos encontrados nos óleos essenciais. Assim, bactérias Gram-negativas são mais tolerantes as ações dos óleos essenciais (GIANNENAS et al., 2013 , SEOW et al., 2014). No entanto, o timol e carvacrol são capazes de desintegrar a membrana externa através da liberação dos lipopolissacarídeos, demonstrando assim, propriedades antimicrobianas superiores contra Gram-negativos (YANG et al., 2015).

Vários indicadores associados à membrana celular conseguem demonstrar que a sua integridade foi alterada. Um indicador do aumento de permeabilidade da membrana celular é o vazamento de potássio para o meio extracelular. Estudos demonstram que os componentes dos óleos essenciais atuam na membrana da célula bacteriana, reduzindo a capacidade de transferência de potássio causando um o extravasamento do íon e perda da viabilidade celular (NGUEFACK et al., 2004; TROMBETTA et al., 2005; XU et al., 2008).

Outro indicador dos danos causados à membrana celular bacteriana é a diminuição no potencial de membrana. O potencial de membrana é importante para processos como síntese de

enzimas, ácidos nucleicos e polissacarídeos envolvidos na manutenção e reparo de danos da célula (OHMIZO; YATA; KATSU, 2005). De acordo com pesquisadores, o potencial de membrana é rapidamente afetado na presença da concentração inibitória mínima de carvacrol (ULTEE et al., 2002; VELDHUIZEN et al., 2006) e cinamaldeído (BOUHDID et al., 2010).

Outros autores observaram que também há um efeito na manutenção do pH da célula, importante para a sua sobrevivência. Óleos essenciais como o de orégano, canela e laranja, bem como os seus compostos fenólicos são capazes de romper a membrana da célula prejudicando a manutenção do gradiente do pH essencial para uma força motriz de próton (OUSSALAT et al., 2006; FITZGERALD et al., 2004; FISHER E PHILIPS, 2009).

2.6.2 Efeito na microbiota intestinal

A diversidade genética da microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos é muito grande. Estima-se que contenha de 500 a 1000 espécies bacterianas interagindo constantemente com o hospedeiro (KIM & ISAACSON, 2015). O intestino do suíno é considerado livre de microrganismo antes do nascimento e rapidamente é colonizado durante o processo do parto e ambiente.

Os microrganismos colonizadores desenvolvem uma microbiota extremamente diversificada que se altera ao longo do tempo. Essa alteração pode ser entendida como sucessão de microrganismos que tende a se tornar estável durante o crescimento dos animais, e consequentemente, mais resistente as alterações nas dietas (PALMER et al., 2007; KIM & ISAACSON, 2015).

Os leitões são considerados mais vulneráveis às infecções por patógenos comparados aos suínos adultos. Portanto, é importante modular a microbiota intestinal do animal ainda jovem com o intuito de ter uma microbiota saudável e estável para o melhor desempenho dos animais.

Fatores como a ingestão de alimentos sólidos são importantes para o processo de sucessão em direção a uma microbiota estável. Diferentes estudos demonstraram que óleos essenciais aumenta o número de *Lactobacillus* e diminuem o número de *Escherichia coli* em leitões desmamados (LI et al., 2012 , ZENG et al., 2015a, WEI et al., 2017).

De acordo com Michiels et al. (2008), após duas horas da administração oral para leitões de um *blend* composto por carvacrol, timol, eugenol e cinamaldeído, houve uma absorção quase completa no intestino delgado. Deste modo, os óleos essenciais precisam ser

protegidos para que seus efeitos antimicrobianos se expressem no intestino grosso (DE LANGE et al., 2010).

Segundo Ushida, Maekawa & Arakawa (2002), a inclusão de extratos de *Mentha piperita*, *Perilla frutescens* e *Ajuga decumbens* alterou o metabolismo bacteriano resultando em menor produção de compostos voláteis de enxofre no ceco de suínos, mas não foi observada alteração na quantidade de ácidos graxos de cadeia curta.

Contudo, ainda são necessários estudos utilizando diferentes abordagens como as tecnologias moleculares e uso da bioinformática para monitorar amplamente as alterações na composição da microbiota em resposta as alterações feitas nas dietas como a inclusão de aditivos alternativos (OMONIJO et al., 2018).

Por apresentarem efeitos contra microrganismos patogênicos, espera-se que os óleos essenciais tenham efeito indireto na morfologia intestinal. De acordo com Mourão et al. (2006), a diminuição do número de bactérias patogênicas no intestino pode melhorar a capacidade das células epiteliais de regeneração dos vilos e por consequência, melhorar a absorção de nutrientes.

Contudo, dados na literatura com o uso de óleos essenciais são contraditórios em relação à morfologia intestinal. Diferentes resultados mostram aumento, nenhuma alteração e redução do comprimento das vilosidades e da profundidade de cripta no jejuno e no cólon de frangos de corte e leitões alimentados com dietas contendo óleos essenciais (JAMROZ et al., 2005; MANZANILLA et al.; 2009; LI et al., 2012; ZENG et al.; 2014).

2.6.3 Imunomodulação intestinal

O intestino é caracterizado por várias funções importantes como a absorção de nutrientes, eletrólitos e água, proteção através de uma barreira seletiva e secreção de imunoglobulinas e citocinas que atuam contra antígenos, toxinas e patógenos (LALLÈS et al., 2004). O sistema imunológico de mucosas como a do intestino deve equilibrar duas funções distintas: de ser tolerante a antígenos derivados de bactérias comensais e dos componentes da dieta, mas também de apresentar uma resposta imune contra patógenos (PITMAN & BLUMBERG, 2000).

De acordo com Yang et al. (2015) o processo inflamatório intestinal em suínos pode ser associado a fatores como patógenos, nutrição e manejo, causando redução significativa no desempenho e perdas econômicas. Assim, estratégias nutricionais se tornam importantes para inibir o processo inflamatório no intestino. Alguns imunomodulares têm sido avaliados para

estimular o sistema imune (QURESHI, 2002). Este estímulo é consequência da diminuição do estresse imunológico, resultado de um sistema imune mais preparado para responder eficientemente a um desafio (FERKET, 1999).

Os óleos essenciais podem contribuir para uma resposta imunológica mais eficiente. Segundo Li et al. (2012), uma mistura de óleos essenciais composto por timol e cinamaldeído melhorou a proliferação de linfócitos e níveis de imunoglobulinas (Ig) IgA, IgG e IgM em leitões desmamados. De acordo com Su et al. (2018), a suplementação de óleos essenciais para leitões desmamados aumentou os níveis de IgG e IgM à medida em que a concentração dos óleos aumentava.

Durante o processo inflamatório, o NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa beta*) é um fator de transcrição envolvido neste processo. Há evidências de que a relação entre as vias do NF- κ B e Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2*) e a menor expressão do gene Nrf2 poderia aumentar a susceptibilidade ao processo inflamatório (KHOR et al., 2006).

Pesquisas demonstraram que os óleos essenciais influenciam os fatores de transcrição NF- κ B e Nrf2 para reduzir a inflamação (ZOU et al., 2016; LI et al., 2017). De acordo com o estudo de Zou et al. (2016), o óleo de orégano aumentou a expressão de Nrf2 e impediu a ativação do NF- κ B. Estes resultados sugerem uma redução na inflamação e consequentemente melhora no desempenho de suínos através da modificação das vias Nrf2 e NF- κ B.

2.6.4 Atividade antioxidante

Os suínos são frequentemente expostos a agentes estressores no atual sistema de produção, como o desmame precoce, estresse por calor, desafios sanitários, densidade animal e transporte. Por consequência dessa exposição, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, causando o estresse oxidativo caracterizado pelo excesso de ROS e menor capacidade antioxidante (OMONIJO et al., 2018).

As células possuem um sistema de defesa para controlar esse estresse oxidativo através de compostos não enzimáticos, como a vitamina E e compostos enzimáticos como glutathione peroxidase, superóxido desmutase e catalase (AKBARIAN et al., 2016).

Os óleos essenciais também são conhecidos pelos seus efeitos antioxidantes. Os compostos ativos geralmente encontrados com capacidade antioxidante apresentam em sua estrutura química compostos fenólicos, flavonóides e terpenóides (TRAESEL et al., 2011). Os fenóis atuam como doadores de hidrogênio para os radicais peróxidos, produzidos durante a

primeira etapa da oxidação de lipídeos, e neutralizam esses radicais impedindo a continuidade desse processo (BRENES & ROURA, 2010).

De acordo com Zou et al. (2016), ao avaliarem os efeitos antioxidantes do óleo essencial de orégano em células epiteliais de intestino delgado de suíno, demonstraram que ROS e malondialdeído (MDA) induzidos por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram eficientemente suprimidos pelo óleo essencial de orégano por induzir a via Nrf2 e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e g-glutamilcisteína ligase.

Além disso, os óleos essenciais podem influenciar na aceitabilidade da ração pelo sabor e odor conferido por esse aditivo. No entanto, os resultados de consumo de ração em suínos ainda não são consistentes (NEILL et al., 2006, STELTER et al., 2013, ZENG et al., 2015b). Outra possibilidade relacionada a maior aceitabilidade da ração está associada ao efeito antioxidante que pode preservar a qualidade da dieta (FRANZ et al., 2010, SOLÀ-ORIOLO et al., 2011).

Alguns antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) são frequentemente utilizados como aditivos em rações para suínos como forma de aumentar a estabilidade da ração, protegendo os nutrientes da oxidação (YANG et al., 2015). Ainda, de acordo com os autores, os antioxidantes sintéticos não possuem nenhum efeito biológico e sua segurança toxicológica é considerada. Assim, as pesquisas por compostos naturais que possam substituir os antioxidantes sintéticos bem como oferecer benefícios zootécnicos se tornam interessantes.

2.6.5 Atividade enzimática

A presença de enzimas durante o processo de digestão de nutrientes é um mecanismo chave para a hidrólise de substratos específicos, contribuindo para que esta etapa ocorra adequadamente no trato gastrintestinal dos animais. Diferentes estudos demonstram que os óleos essenciais melhoram a digestibilidade da energia e de nutrientes (YAN et al., 2010; MAENNER et al., 2011; LI et al. 2012; ZENG et al., 2015b). Segundo Platel e Srinivasan (2004), a melhor digestibilidade pode ser atribuída ao aumento da secreção de bÍlis e enzimas estimulado pelos óleos essenciais.

Os óleos essenciais também foram relacionados a regulação da contração do intestino, podendo exercer influência na taxa de passagem e na interação entre enzimas endógenas e alimento no intestino (ZHAI et al., 2018). Os mecanismos relacionados a essas mudanças

podem estar associadas a presença de terpenos que podem atuar nos canais iônicos dependentes de voltagem (DE ARAÚJO et al., 2011).

O sistema quimiossensorial constituído de nervos e receptores presente no intestino tem sido avaliado devido a sua capacidade de regular a digestão e absorção de nutrientes melhorando a saúde do intestino (MACE & MARSHALL, 2013).

Em sua maioria, o epitélio intestinal é constituído por células epiteliais absorptivas, em menor quantidade de células entereoadócrinas capazes de secretar hormônios peptídeos, e receptores gustativos (MURPHY et al., 2006; SHIRAZI-BEECHEY et al., 2014).

Todos esses receptores de nutrientes pertencem a um grupo de receptores acoplados a proteína-G, que assumem como principal função o transporte e absorção de nutrientes presentes no lúmen (REIMANN et al., 2012). Além disso, podem atuar como quimiossensores contribuindo para a detecção desses nutrientes, sugerindo que outros compostos como os óleos essenciais também possam ser detectados por sensores químicos ainda não identificados.

Esses quimiossensores traduzem informações sobre a concentração e o perfil de nutrientes presentes no lúmen intestinal para a regulação da expressão gênica intestinal e de enzimas digestivas, influenciando no controle do consumo, digestão e absorção (OMONJO et al., 2018). Estudos como o de Liu et al. (2014), demonstram que compostos fitogênicos podem regular a expressão gênica da mucosa ileal. Porém, estes mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo muito importante identificar os receptores específicos para óleos essenciais.

2.6.6 Desafios e perspectivas

O modo de ação dos óleos essenciais ainda não é totalmente compreendido, por isso, os resultados de pesquisa são ambíguos e discrepantes em relação aos efeitos na saúde e no desempenho animal (YANG et al., 2015). De acordo com Figueiredo et al. (2008), diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos das plantas podem influenciar a composição química dos óleos essenciais como fatores genéticos, condições ambientais, condições de armazenamento e técnicas de extração.

A padronização da qualidade e quantidade de óleos essenciais pode ser obtida por melhores condições de cultivo e tempo de colheita, assim como técnicas relacionadas a engenharia genética (PAVELA & BENELLI, 2016).

Os estudos de isolamento e a identificação de compostos bioativos são importantes para determinar os mecanismos de ação e os efeitos biológicos dos óleos essenciais e devem

apresentar informações detalhadas de sua composição química. É necessário estabelecer uma correlação confiável entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, especialmente na padronização dos estudos com animais.

Embora os óleos essenciais estejam no grupo de compostos fitogênicos conhecidos como alternativas naturais aos antibióticos e são Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS), pela *Food and Drug Administration* (FDA, USA 2018), não se tem definido métodos analíticos capazes de identificar e quantificar esses compostos em rações e tecidos animais.

Segundo Zeng et al., (2015a), a complexidade química dos óleos, a extensa diversidade microbiológica do intestino e suas diferentes funções exigem uma abordagem ampla na determinação dos mecanismos de ação. Outro aspecto observado é que a concentração inibitória mínima (CIM), que é considerada como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um microrganismo da maioria dos óleos essenciais, é relativamente maior do que os níveis aceitáveis na indústria animal considerando o custo e a palatabilidade do alimento (YANG et al., 2015).

Além disso, o uso dos óleos essenciais em dietas está relacionado a alta reatividade desses compostos. Reduzir a reatividade e os impactos nas propriedades organolépticas da ração e ao mesmo tempo, manter as suas propriedades biológicas se torna um desafio. As propriedades podem ser alteradas pela temperatura, luz, presença de água e oxigênio (TUREK & STINTZING, 2013), além da rápida absorção intestinal relatada por Michiels et al. (2008).

Assim, tecnologias como o encapsulamento dos óleos estão sendo desenvolvidas para proteger os compostos da degradação e oxidação durante o processamento e condições fisiológicas do intestino (STEVANOVIĆ et al., 2018). O uso de técnicas como o encapsulamento dos óleos é fundamental para estabelecer um produto de qualidade que seja seguro e eficiente e ao mesmo tempo rentáveis.

Na busca por maior conhecimento sobre a dinâmica da microbiota, a interação entre elas é pesquisada. A comunicação entre as células bacterianas conhecido como *quorum sensing* (QS) é um sistema dependente da densidade populacional bacteriana que utilizada pequenas moléculas de sinalização produzidas pelas bactérias (MILLER & BASSLER, 2011). Como componentes de sinalização, as bactérias Gram-negativas utilizam lactonas de acil-homoserina, enquanto que as bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos modificados.

O QS tem um papel importante na regulação de vários processos como a produção de biofilme, motilidade, resistência ao estresse e, principalmente, na expressão de fatores de

virulência (O'BRYAN et al., 2015; JOSHI et al., 2016). De acordo com Deep et al. (2011), acredita-se que o QS reduza a resposta imunológica do hospedeiro ao retardar a produção de fatores de virulência até que se estabeleça uma população bacteriana presente suficiente para comprometer os mecanismos de defesa e causar uma infecção.

Estudos mostram que diferentes óleos essenciais podem interferir no QS de bactérias patogênicas e que o eugenol e o carvacrol são os compostos mais perturbadores dessa comunicação (BURT et al., 2014; MITH et al., 2015; OMONIJO et al., 2018).

Pequenas moléculas naturais ou sintéticas podem interromper a expressão de genes de virulência regulados pelo QS. Outra estratégia para inibir o QS é a degradação das moléculas de sinalização através de enzimas. Existem 3 classes de enzimas que incluem a lactonases, acilases e oxirredutases, hidrolisando as moléculas de sinalização, tornando-as não ativas (HONG et al., 2011).

Porém, os resultados encontrados vieram dos estudos *in vitro* e relacionados a microbiologia de alimentos (KEREKES et al., 2013, ALVAREZ et al., 2014). Portanto, a interferência no QS pode ser uma ferramenta promissora para o controle de patógenos entéricos na produção de suínos, ainda que são necessários mais estudos para identificação de inibidores e seus mecanismos de aplicação.

Os óleos essenciais têm uma variedade de compostos ativos e, por isso, são uma das alternativas antibióticas mais promissoras. Contudo, sua utilização na produção animal tem sido limitada devido a imprecisão dos resultados e incompreensão total dos mecanismos de ação. Um maior entendimento da atuação dos óleos principalmente na microbiota intestinal, fisiologia e imunologia do intestino, possibilitará o melhor uso desse aditivo na produção de suínos.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização de aditivos alternativos aos antibióticos melhoradores de desempenho tem sido alvo de diversas pesquisas na nutrição de suínos, uma vez que o uso de antibióticos tem sofrido inúmeras restrições em decorrência do uso indiscriminado e, conseqüentemente, prejuízos à saúde humana e animal. Os óleos essenciais apresentam características antimicrobiana, antioxidantes e imunomoduladoras capazes de conferir benefícios à saúde do animal, especialmente aos leitões no período pós-desmame e nas fases subsequentes. Conhecer cada vez mais os compostos majoritários dos óleos, suas propriedades e combinações se faz necessário, assim como elucidar os diferentes mecanismos de ação para que se torne uma alternativa cada vez mais efetiva na alimentação de suínos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.
- AKBARIAN, A. et al. Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. *Poultry science*, v. 93, n. 8, p. 1930-1941, 2014.
- AKBARIAN, A. et al. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 37, 2016.
- ALLEN, G M. et al. 50 Common Native Plants Important In Florida's **Ethnobotanical History**. 2012.
- ALLEN, H. K. et al. Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1323, n. 1, p. 91-100, 2014.
- AL-SADI, R. et al. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 14, p. 2765, 2009.
- ALVAREZ, M. V. et al. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p. 699, 2014.
- ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, n. 26, v.1, p. 34-40, 2014.
- BACH K., E. and H. JORGENSEN. Intestinal degradation of dietary carbohydrates-from birth to maturity. In: J.E. Lindberg and B. Ogle (editors) *Digestive Physiology of Pigs*. **CABI Publishing**, United Kingdom, pp.110-120, 2001.
- BARCELLOS et al. Practical aspects on the use of antimicrobials in pig production. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(Supl 1): s151-s155, 2009.
- BEZERRA, W. G. A. et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. *Archivos de zootecnia*, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.
- BHAT, B. G.; CHANDRASEKHARA, N. Studies on metabolism of piperine: absorption, tissue distribution and excretion of urinary conjugates in rats. *Toxicology*, **Limerick**, v. 40, n. 1, p. 83-92, 1986.
- BLIKSLAGER, A. T. et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiological reviews*, v. 87, n. 2, p. 545-564, 2007.
- BOUHADDOUDA, N. et al. Evaluation of Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (Desf.)

Ietswaart from Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, v. 8, p. 104-112, 2016.

BOUHDID, S. et al. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 4, p. 1139-1149, 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 45** de 22 de novembro de 2016. Proíbe, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 30 nov. 2016. Seção 1, p. 6, 2016.

BRASIL, **Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas**. Riqueza de espécies. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em: 21 de dezembro 2018.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa 45. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/do1-2016-11-30-instrucao-normativa-n-45-de-22-de-novembro-de-2016-22078259. Acessado em: 02 de janeiro de 2019.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Portaria nº 171. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55878469. Acessado em: 02 de janeiro de 2019.

BRENES, Agustín; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.

BROOKS, P.H.; TSOURGIANNIS, C.A. Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig. In: Pluske JR, Le Dividich J, Verstegen MWA, editors. The weaning pig: concepts and consequences. Wageningen. The Netherlands: **Wageningen Academic Publishers**, p. 81-116, 2003.

BRUGALI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. Anais... Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. p.167-182, 2003.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & saúde coletiva*, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

BURRIN, D.; STOLL, B. In: Weaning the Pig: Concepts and Consequences. Pluske JR, Verstegen MWA, Dividich J, editor. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. **Intestinal nutrient requirements in weanling pigs**; pp. 301–335, 2003.

BURT, Sara A. et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. e93414, 2014.

CAMERON, Heather L.; PERDUE, Mary H. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 1, p. 214-220, 2005.

CAMPBELL, Joy M.; CRENSHAW, Joe D.; POLO, Javier. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19, 2013.

CANADÁ. **Health Canada** (2014). Notice to Stakeholders: Collaborative efforts to promote the judicious use of medically-important antimicrobial drugs in food animal production. Disponível em: <http://www.hcsc.gc.ca/dhp-mps/vet/antimicrob/amr-notice-ram-avis-20140410-eng.php>. Acessado em: 02 de janeiro de 2019.

CARSON, Christine F.; MEE, Brian J.; RILEY, Thomas V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CHAMONE, J.M.A. et al. Fisiologia digestiva de leitões. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.7, n.5, p.1353-1363, 2010.

CHEN, Zhenyong et al. Effect of glucagon-like peptide-2 on modulation of intestinal epithelium tight junction in rats with obstructive jaundice [J]. **Chinese Journal of General Surgery**, v. 8, 2008.

CHENG, Guyue et al. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 217, 2014.

CHITPRASERT, Pakamon; SUTAPHANIT, Polin. Holy basil (Ocimum sanctum Linn.) essential oil delivery to swine gastrointestinal tract using gelatin microcapsules coated with aluminum carboxymethyl cellulose and beeswax. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12641-12648, 2014.

COATES, Marie E. et al. A 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**, v. 17, n. 1, p. 141-150, 1963.

CODDENS, Annelies et al. The age-dependent expression of the F18+ E. coli receptor on porcine gut epithelial cells is positively correlated with the presence of histo-blood group antigens. **Veterinary microbiology**, v. 122, n. 3-4, p. 332-341, 2007.

CORREIA, S. J, et al. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de Tapirira guianensis. **Química Nova**. v. 31, n° 8, p. 2056-2059, 2008.

COSTA, Matheus O. et al. Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with "Brachyspira hamptonii". **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e106399, 2014.

D'COSTA, Vanessa M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457, 2011.

DE ARAÚJO, Demetrius Antonio Machado; FREITAS, Christiane; CRUZ, Jader Santos. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life sciences**, v. 89, n. 15-16, p. 540-544, 2011.

DE LANGE, C. F. M. et al. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**, v. 134, n. 1-3, p. 124-134, 2010.

DE MARTINO, L. et al. (ed). 1º Ed. Essencial oils from Mediterranean Aromatic Plants. The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach. Londres: **Elsevier**, 2014.

DEEP, Antariksh; CHAUDHARY, Uma; GUPTA, Varsha. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. **Journal of laboratory physicians**, v. 3, n. 1, p. 4, 2011.

DREAU, D. and J-P. LALLES. Contribution to the study of gut hypersensitivity reactions to soybean proteins in preruminant calves and early-weaned piglets. **Livestock Production Science** 60, 209- 218, 1999.

DUMONCEAUX, Tim J. et al. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 4, p. 2815-2823, 2006.

FDA. **Food and drugs**, 21e-CFR182. Disponível online https://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#_top (Acessado em 12 de dezembro, 2018).

FENIMAN, C. M.; RALL, V. L.; DOYAMA, J. T.; JÚNIOR, A. F. (2012). Cell enumeration and visualisation by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil. **Nat Prod Res**, v.26, n.18, p. 1721-1723. 2012.

FERKET, P. R. Fatores que afetam a resposta imunológica: nutrição. In: CONGRESSO DE PRODUÇÃO E CONSUMO DE OVOS. São Paulo. Anais... São Paulo: **Associação Paulista de Avicultura**, 1999. p. 53-69, 1999.

FERNANDES, Miriam R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01325-16, 2016.

FIGUEIREDO, A. Cristina et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FINKEL, Toren. Oxidant signals and oxidative stress. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 2, p. 247-254, 2003.

FISHER K, PHILLIPS C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **J Appl Microbiol** (2009) 106:1343–9, 2009.

FITZGERALD DJ, M de Stratford, MJ de Gasson, Ueckert J, Bos A, Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **J Appl Microbiol** (2004) 97:104–13, 2004.

FRANCESCHINA et al. A colistina como promotor de crescimento na suinocultura: impacto na saúde. *Revista eletrônica Nutritime*. Vol. 16, Nº 01, ISSN: 1983-9006, Jan/Fev de 2019.

FRANZ, C.; BASER, K. H. C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 327-340, 2010.

FRESE, Steven A. et al. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 28, 2015.

FUKATSU, Kazuhiko; KUDSK, Kenneth A. Nutrition and gut immunity. **Surgical Clinics**, v. 91, n. 4, p. 755-770, 2011.

GARCÍA, Gisela Romina et al. Effect of breast feeding time on physiological, immunological and microbial parameters of weaned piglets in an intensive breeding farm. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 176, p. 44-49, 2016.

GAVIOLI, D.F. Efeitos de promotores de crescimento para suínos sobre o desempenho zootécnico, a qualidade intestinal e a eficiência da biodigestão dos dejetos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, 65p. 2012.

GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. The continuum of intestinal CD4+ T cell adaptations in host-microbial mutualism. **Gut Microbes**, v. 2, n. 6, p. 353-357, 2011.

GEWIRTZ, A. T. et al. Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 851-867, 2002.

GIANNENAS, I. et al. Essential oils and their applications in animal nutrition. *Med. Aromat. Plants*, v. 2, n. 140, p. 2167-0412.1000140, 2013.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p. 374-381. 2007.

GONG, J. et al. Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: Potential and challenges in application. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 94, n. 2, p. 223-241, 2014.

GRESSE, R. et al. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 10, p. 851-873, 2017.

GUARDA, A., RUBILAR, J. F., MILTZ, J., & GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **Int J Food Microbiol**, v. 146, n.2, p.144- 150. 2011.

HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry** 30(12):3864-3874, 1991.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera lactobacillus and carnobacterium. The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, **Cyanobacteria**, p. 320-403, 2006.

HEO, J. M. et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013.

HONG, Kar-Wai et al. Quorum quenching revisited—from signal decays to signalling confusion. **Sensors**, v. 12, n. 4, p. 4661-4696, 2012.

HOPWOOD, D. E.; HAMPSON, D. J. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. **Weaning the pig: concepts and consequences**, p. 199-217, 2003.

HOUGHTLING, P. D.; WALKER, W. A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, v. 60, n. 3, p. 294, 2015.

HOWE, K. L. et al. Transforming growth factor- β regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7-induced increased permeability. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 6, p. 1587-1597, 2005.

HU, C. H. et al. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1094-1101, 2013.

HU, C. H. et al. Zinc oxide influences intestinal integrity, the expressions of genes associated with inflammation and TLR4-myeloid differentiation factor 88 signaling pathways in weanling pigs. **Innate immunity**, v. 20, n. 5, p. 478-486, 2014.

IMS

HEALTH

https://issuu.com/ims_heor_publications/docs/ims_rwe_accesspoint_orb1151_final_1. Acesso em: 03 jan, 2019.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature** 431: 931–945, 2004.

ISAACSON, R.; KIM, H. B. The intestinal microbiome of the pig. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 100-109, 2012.

JAMROZ, D. et al. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. **British poultry science**, v. 46, n. 4, p. 485-493, 2005.

JOSHI, J. R. et al. Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. **Scientific reports**, v. 6, p. 38126, 2016.

KAMADA, N. et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321, 2013.

- KAZIMIERCZAK, K. A.; SCOTT, K. P. Antibiotics and resistance genes: influencing the microbial ecosystem in the gut. **Advances in applied microbiology**, v. 62, p. 269-292, 2007.
- KELLY, D. and A.G.P. COUTTS. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proceedings of the Nutrition Society** 59, 177-185, 2000.
- KEREKES, E.-B. et al. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 4, p. 933-942, 2013.
- KHOR, T. O. et al. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. **Cancer research**, v. 66, n. 24, p. 11580-11584, 2006.
- KIM, H. B. et al. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. **Veterinary microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 124-133, 2011.
- KIM, J.C. et al. Nutrition and pathology of weaned pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 3-16, 2012.
- KIM, H. B. & ISAACSON, R. E. The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. **Veterinary microbiology**, v. 177, n. 3-4, p. 242-251, 2015.
- KOHLERT, C. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. **Planta medica**, v. 66, p. 495-505, 2000.
- LALLÈS, J.P. et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, v.53, p.301–316, 2004.
- LALLÈS, J.P. et al. Weaning—a challenge to gut physiologists. **Livestock Science**, v. 108, n. 1-3, p. 82-93, 2007a.
- LALLÈS, J.P. et al. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 2, p. 260-268, 2007b.
- LANGE, C. F. M. et al. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**.134, p. 124-134, 2010.
- LE DIVIDICH, J.; HERPIN, P. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. **Livestock Production Science**, v. 38, n. 2, p. 79-90, 1994.
- LEWIS, M. C. et al. Direct experimental evidence that early-life farm environment influences regulation of immune responses. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, n. 3, p. 265-269, 2012.
- LI, P. et al. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 25, n. 11, p. 1617, 2012.

- LI, H. et al. Thymol improves high-fat diet-induced cognitive deficits in mice via ameliorating brain insulin resistance and upregulating NRF2/HO-1 pathway. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 2, p. 385-393, 2017.
- LI, Y. et al. Weaning Stress Perturbs Gut Microbiome and Its Metabolic Profile in Piglets. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 18068, 2018.
- LIN, J. Effect of antibiotic growth promoters on intestinal microbiota in food animals: a novel model for studying the relationship between gut microbiota and human obesity?. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 53, 2011.
- LIU, Y. et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in weaned pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 552-560, 2008.
- LIU, Y. et al. Effects of capsicum oleoresin, garlic botanical, and turmeric oleoresin on gene expression profile of ileal mucosa in weaned pigs. **Journal of animal science**, v. 92, n. 8, p. 3426-3440, 2014.
- LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human being in China: a microbiological and molecular biological study, **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, p. 161- 168, 2016.
- LIU, Y. et al. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p. 1414-1424, 2017.
- LOOFT, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfield, R. D., et al. (In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 109, 1691–1696, 2012.
- LUCHESE, F, C. Óleos essenciais de oregano e alecrim na prevenção e no tratamento da diarreia neonatal em leitões. Dissertação de Mestrado. Program de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria –RS, 2009.
- LUNNEY, J. K. Advances in swine biomedical model genomics. **International journal of biological sciences**, v. 3, n. 3, p. 179, 2007.
- LUPPI, A. et al. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. **Porcine Health Management**, v. 2, n. 1, p. 20, 2016.
- LUTFI, M.; ROQUE, N. F. **Histórias de Eugênicas. Química Nova na Escola.** v. 36, n° 4, p. 252-260, 2014.
- LUZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. **PHYSYS: Revista de Saúde Coletiva**, v.15, p. 145-176, 2005.
- MACE, O. J.; MARSHALL, F. Digestive physiology of the pig symposium: gut chemosensing and the regulation of nutrient absorption and energy supply. **Journal of animal science**, v. 91, n. 5, p. 1932-1945, 2013.

- MACH, N. et al. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. **Environmental microbiology reports**, v. 7, n. 3, p. 554-569, 2015.
- MADEC, F. et al. Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. **Veterinary microbiology**, v. 72, n. 3-4, p. 295-310, 2000.
- MAENNER, K.; VAHJEN, W.; SIMON, O. Studies on the effects of essential-oil-based feed additives on performance, ileal nutrient digestibility, and selected bacterial groups in the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of animal science**, v. 89, n. 7, p. 2106-2112, 2011.
- MANZANILLA, E. G. et al. Dietary protein modifies effect of plant extracts in the intestinal ecosystem of the pig at weaning. **Journal of animal science**, v. 87, n. 6, p. 2029-2037, 2009.
- MARTINEZ, V. et al. Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain. **Peptides**, v. 25, n. 10, p. 1733-1744, 2004.
- MCLAMB, Brittney L. et al. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic E. coli challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e59838, 2013.
- MICHIELS, J. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2371-2381, 2008.
- MICHIELS, Joris. Effect of essential oils on gut bacteria and functionality in the pig. **Tese de Doutorado, Ghent University**, 2009.
- MILLER M.B & BASSLER B.L. Quorum sensing in bacteria. **Annu Rev Microbiol** .55:165–99, 2011.
- MINAMOTO, Y. et al. Prevalence of Clostridium perfringens, Clostridium perfringens enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. **Veterinary microbiology**, v. 174, n. 3-4, p. 463-473, 2014.
- MITH, H. et al. The impact of oregano (Origanum heracleoticum) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by Escherichia coli O157: H7. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 1, p. 1-7, 2015.
- MOESER, A. J. et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 1, p. G173-G181, 2007.
- MOESER, A. J. et al. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 313-321, 2017.
- MONTAGNE, L. et al. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 45-57, 2007.
- MORÉS, N. É possível produzir suínos sem o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho?. In: Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE). In:

CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 6., 2014, São Pedro, SP. Anais... São Pedro, SP: **CBNA**, 2014.

MORITZ, C. M.; RALL, V. L.; SAEKI, M. J.; FERNANDES JÚNIOR, A. Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. **Braz J Microbiol.**, v. 43, n.3, p. 1147-1156. 2012.

MOURÃO, J. L. et al. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 1-2, p. 107-120, 2006.

MUELLER, K. et al. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic-and antioxidant enzymes in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 588-602, 2012.

MURPHY, K. G.; DHILLO, W. S.; BLOOM, S. R. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 7, p. 719-727, 2006.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 443-454, 2005.

NEILL, C. R. et al. Effects of oregano oil on growth performance of nursery pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 14, n. 6, p. 312-316, 2006.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B. B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in applied microbiology**, v. 39, n. 5, p. 395-400, 2004.

NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

O'BRYAN, C. A. et al. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—in vitro studies on antibacterial mode of action. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, p. 35, 2015.

OHMIZO C., Yata M., Katsu T. Bacterial cytoplasmic membrane permeability assay using ion-selective electrodes. **J Microbiol Methods** 59:173–9, 2004.

OHNMACHT, C. et al. Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 5, p. 653-659, 2011.

OMONJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 126-136, 2018.

OMS: **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em 03 de janeiro de 2019.

OUSSALAH M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **J Food Prot.** 69:1046–55, 2006.

PAJARILLO, E. ALAIN B. et al. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 60, n. 4, p. 140-146, 2014.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS biology**, v. 5, n. 7, p. e177, 2007.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in plant science**, v. 21, n. 12, p. 1000-1007, 2016.

PETRI, D.; HILL, J. E.; VAN KESSEL, A. G. Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. **Livestock Science**, v. 133, n. 1-3, p. 107-109, 2010.

PIÉ, S. et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 641-647, 2004.

PITMAN, R. S.; BLUMBERG, R. S. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. **Journal of gastroenterology**, v. 35, n. 11, p. 805-814, 2000.

PLACHA, I. et al. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. **British poultry science**, v. 55, n. 1, p. 105-114, 2014.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 5, p. 167, 2004.

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**. 51, 215–236, 1997.

PLUSKE, J. R. et al. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pig. **Nutrition Research Reviews**, v. 15, n. 2, p. 333-371, 2002.

PLUSKE, J. R.; LE DIVIDICH, Jean; VERSTEGEN, Martin WA (Ed.). Weaning the pig: concepts and consequences. **Wageningen Academic Pub**, 2003.

PLUSKE, J. R. Feed-and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2013.

PUVAČA, N. et al. Beneficial effects of phytoadditives in broiler nutrition. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, n. 1, p. 27-34, 2013.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59, 2010.

QURESHI, M. A. Interação entre nutrição e o sistema imune e produtividade das aves. In: CONFERÊNCIA APINCODE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, São Paulo. Anais... Campinas: **FACTA**, v. 2, p. 243-251, 2002.

- RASHID, M.U. et al. Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. **Anaerobe**, 18(2), pp.249-253, 2012.
- REIMANN, F.; TOLHURST, G.; GRIBBLE, F. M. G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation. **Cell metabolism**, v. 15, n. 4, p. 421-431, 2012.
- RIVERA CALDERÓN, L. G. et al. Resistance of Salmonella to conventional antimicrobials for their treatment. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 7, n. 1, p. 116-129, 2012.
- ROCHA, FAG da et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, 2015.
- ROLAIN, J.M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 173, 2013.
- ROOKE, J. A.; BLAND, I. M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, v. 78, n. 1, p. 13-23, 2002.
- RUTH, M. R.; FIELD, C. J. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 27, 2013.
- SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 72, 143-155. 1999.
- SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 9, p. 412-416, 2004.
- SCHOKKER, D. et al. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100040, 2014.
- SCOTT, K. P. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 59, n. 12, p. 2071-2082, 2002.
- SEFTON, A. M. Mechanisms of antimicrobial resistance. **Drugs**, v. 62, n. 4, p. 557-566, 2002.
- SEOW, Y. X. et al. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.
- SHARMA, P.; TOWSE, A. New drugs to tackle antimicrobial resistance: analysis of EU policy options. 2010.
- SHARMA, P. K.; et al. Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (Palmarosa, *Cymbopogon martinii* var. *Motia*) leaf. **Plant Sci.**, v. 203, p.63-73. 2013.
- SHIRAZI-BEECHEY, S. P. et al. Role of nutrient-sensing taste 1 receptor (T1R) family members in gastrointestinal chemosensing. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. S1, p. S8-S15, 2014.
- SILVA, J.P.L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella enteritidis*. **Ciência E Tecnologia de Alimentos** 30(1): 136–141, 2010.

SILVA, C. A. Aditivos Promotores de Crescimento e Repartidores de Nutrientes na Nutrição de Suínos. **Produção de Suínos: Teoria e Prática**. ABCS, Brasília 2014.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.

SINDAN - **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN)**, Anuário 2018, disponível em: <http://www.sindan.org.br/anuario2018/>. Acessado em 23 de dezembro de 2018.

SKANDAMIS, P. et al. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157: H7 [food hygiene]. **Italian Journal of Food Science (Italy)**, 2001.

SOLANO-AGUILAR, G. I. et al. Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 3, p. 245-263, 2001.

SOLÀ-ORIO, D.; ROURA, E.; TORRALLARDONA, D. Feed preference in pigs: Effect of selected protein, fat, and fiber sources at different inclusion rates. **Journal of animal science**, v. 89, n. 10, p. 3219-3227, 2011.

SPELLBERG, B. New antibiotic development: barriers and opportunities in 2012. **APUA Clinical Newsletter**, v. 30, n. 1, p. 8-10, 2012.

SPURLOCK, M. E. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 7, p. 1773-1783, 1997.

STELTER, K. et al. Effects of oregano on performance and immunomodulating factors in weaned piglets. **Archives of animal nutrition**, v. 67, n. 6, p. 461-476, 2013.

STEVANOVIĆ, Z. et al. Essential Oils as Feed Additives—Future Perspectives. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1717, 2018.

STOKES, C. R. et al. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. **Animal Research**, v. 53, n. 4, p. 325-334, 2004.

SU, G. et al. Effects of plant essential oil supplementation on growth performance, immune function and antioxidant activities in weaned pigs. **Lipids in health and disease**, v. 17, n. 1, p. 139, 2018.

SURYANAYARA, M.V.A.N.; SURESH, J.; RAJASEKHAR, M. V. Organic acids in swine feeding - A review. **Agricultural Science Research Journals**, v.2, n. 9, p. 523- 533, 2012.

SUZUKI, H. et al. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, p. 1112080129-1112080129, 2011.

TAN, C. et al. Effects of dietary supplementation of oregano essential oil to sows on oxidative stress status, lactation feed intake of sows, and piglet performance. **BioMed research international**, v. 2015.

TANG, K. L. et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a

systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p. e316-e327, 2017.

THOMPSON, C. L.; WANG, Bing; HOLMES, Andrew J. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. **The ISME Journal**, v. 2, n. 7, p. 739, 2008.

TRAESEL, C. K.; LOPES, S. T. A.; WOLKMER, P.; SCHMIDT, CANDICE; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 41, n. 2, p. 278-284, 2011

TROMBETTA D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother** (2005) 49:2474–8, 2005.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

TURNER, J. R. et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 273, n. 4, p. C1378-C1385, 1997.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

USHIDA, K.; MAEKAWA, M.; ARAKAWA, T. Influence of dietary supplementation of herbs extracts on volatile sulfur production in pig large intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 18-23, 2002.

VALENZUELA-GRIJALVA, N. V. et al. Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. **Journal of animal science and technology**, v. 59, n. 1, p. 8, 2017.

VAN BAARLEN, P.; WELLS, J. M.; KLEEREBEZEM, M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. **Trends in immunology**, v. 34, n. 5, p. 208-215, 2013.

VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, **Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries**, Rotterdam, p. 116, 1999.

VELDHUIZEN, E. J.A. et al. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874-1879, 2006.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. v. 26, n° 3, p. 390-400, 2003.

VIGAN, M. Essential oils: renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**, 20 (6), pp. 685–692, 2010.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S.L. Ácidos orgânicos e suas misturas em dietas de suínos. In: SIMPÓSIO SOBREMANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2., 2003, Cascavel. Anais... Cascavel: **Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 2003. p. 153-182, 2003.

WANG, F. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. **The American journal of pathology**, v. 166, n. 2, p. 409-419, 2005.

WANG, M. et al. Mode of Delivery and Early Nutrition Modulate Microbial Colonization and Fermentation Products in Neonatal Piglets–3. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 6, p. 795-803, 2013.

WANG, S. et al. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 603, 2016.

WARD, D. V. et al. Metagenomic sequencing with strain-level resolution implicates uropathogenic *E. coli* in necrotizing enterocolitis and mortality in preterm infants. **Cell reports**, v. 14, n. 12, p. 2912-2924, 2016.

WEARY, D. M.; JASPER, Jennifer; HÖTZEL, Maria J. Understanding weaning distress. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 1-2, p. 24-41, 2008.

WEI, H.-K. et al. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v. 11, n. 2, p. 193-201, 2017.

WIJTEN, P. J.A; VANDER MEULEN, J.; VERSTEGEN, M. W.A. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 7, p. 967-981, 2011.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. WA; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition research reviews**, v. 14, n. 2, p. 207-228, 2001.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.

XU, J. et al. Regulation of an antioxidant blend on intestinal redox status and major microbiota in early weaned piglets. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 584-589, 2014.

YAN, L. et al. Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. **Livestock Science**, v. 128, n. 1-3, p. 115-122, 2010.

YANG, H.; XIONG, X.; YIN, Y. Development and renewal of intestinal villi in pigs. In: **Nutritional and physiological functions of amino acids in pigs**. Springer, Vienna. p. 29-47, 2103.

YANG, C. et al. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 137-156, 2015.

- YANG, H. et al. Effects of weaning on intestinal upper villus epithelial cells of piglets. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0150216, 2016.
- YU, C. et al. Effect of glucagon-like peptide 2 on tight junction in jejunal epithelium of weaned pigs through MAPK signaling pathway. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 5, p. 733, 2014.
- ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2015a.
- ZENG, Z. et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 279-285, 2015b.
- ZHAI, H. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, 2018.
- ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.
- ZHANG, Y. Q.; XU, R. J. Anatomy and histology of the gastrointestinal tract. The neonatal pig: **Gastrointestinal physiology and nutrition**, 2006.
- ZIMMERMAN, Jeffrey & Karriker, Locke & Ramirez, Alejandro & Schwartz, Kent & Stevenson, Gregory. **Diseases of Swine** 11th Edition, 2010.
- ZIVKOVIC, A. M. et al. Establishment of a milk-oriented microbiota (MOM) in early life: how babies meet their MOMs. **Funct Food Rev**, v. 5, n. 1, p. 3-12, 2013.
- ZOU, Y. et al. Oregano essential oil induces SOD1 and GSH expression through Nrf2 activation and alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IPEC-J2 cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Programa de uso terapêutico e subterapêutico de óleos essenciais em substituição aos antibióticos para suínos

(Norma NBR 6022 (ABNT 2003))

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de óleos essenciais em substituição a um programa de uso de antibióticos sobre a saúde intestinal e o desempenho de leitões recém-desmamados desafiados com *Echerichia coli* K88 + na fase de creche e, posteriormente nas fases de crescimento e terminação. O experimento foi realizado no Centro Experimental de Suínos, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram utilizados 108 leitões (machos castrados), com peso inicial de $6,3 \pm 0,44$ kg e 23 dias de idade, distribuídos em blocos casualizados com nove repetições e quatro leitões por parcela experimental em 3 tratamentos por 127 dias: dieta controle negativo sem a adição de nenhum aditivo (CN); controle positivo: CN + antibiótico (CP); óleos essenciais: CN + *blend* de óleos essenciais composto por 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol. (OE). Foi fornecida uma dose terapêutica de gentamicina (270 mg/kg) para o tratamento CP e uma dose terapêutica do *blend* (40 mg/kg) para o tratamento OE nos primeiros sete dias da fase de creche e, durante o restante do período, uma dose subterapêutica de halquinol (20 mg/kg) para o tratamento CP e uma dose subterapêutica (30 mg/kg) do *blend* para o tratamento OE. Nos dez primeiros dias da fase de crescimento e terminação, foi fornecida uma dose terapêutica (45 mg/kg) de tilosina para o tratamento CP e uma dose terapêutica (40 mg/kg) do *blend* para o tratamento OE e, considerando o restante dos períodos, uma dose subterapêutica de enramicina para o CP no crescimento (12,5 mg/kg) e terminação (6,3 mg/kg) e uma dose subterapêutica (20 mg/kg) do *blend* para o tratamento OE. Nos dias 1,2 e 3 de experimento, todos os leitões foram desafiados com *E. coli* K88+ (1mL a cada dia, 10^7 UFC/ml). Dois dias antes de serem transferidos para a instalação de crescimento e terminação, os animais foram submetidos ao estresse por calor (média de 31,8 °C no primeiro dia e 31,7°C no segundo dia). Foi utilizado o teste de Tukey para a comparação das médias. Não foram observadas diferenças significativas para o desempenho na fase de creche ($P>0,05$). A incidência de diarreia foi menor nos leitões do CP de 0 a 7 dias ($P<0,05$) e reduziu nos animais do OE de 14 a 28 dias ($P<0,05$). A morfologia intestinal, contagem microbiológica, produção de ácidos graxos voláteis, atividade antioxidante e expressão gênica intestinal não foram influenciadas pelos tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para TNF- α nos dias avaliados. Já IL-10 foi menor no tratamento OE comparado ao CP no dia 3, após o desafio e menor comparado ao CN no dia 10 ($P<0,05$). Foi observado maior ganho de peso diário e consumo de ração diário no OE durante a dosagem terapêutica na fase de terminação comparado ao CN ($P<0,05$). Sugere-se com esses resultados que a dose terapêutica de OE tenha um efeito benéfico no desempenho dos animais comparado aos antibióticos além de atenuar a resposta inflamatória, se caracterizando como um possível substituto aos programas de uso dos antibióticos.

Palavras-chave: Aditivo; Desempenho; Imunidade; Leitão.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of essential oils replacing growth promoter antibiotics on intestinal health and the performance of newly weaned piglets challenged with *E. coli* K88 + in the nursery and the growing-finishing phase. The experiment was carried out at Experimental Center of Swine, Department of Animal Science, Federal University of Lavras – UFLA. A total of 108 barrows (6.3 ± 0.44 kg) were weaned at 23 days of age were distributed in randomized blocks with nine replications and four piglets per experimental plot in three treatments for 127 days: negative control diet without the addition of additives (NC); positive control: NC + antibiotic (PC); Essential oils: NC + essential oils blend consisting of 12% carvacrol and 6% cinnamaldehyde, capsaicin, anethole and cineol. (EO). A therapeutic dose of gentamicin (270 mg / kg) was provided for PC treatment and a blend therapeutic dose (40 mg / kg) for EO treatment during the first seven days of the day nursery phase and for the remainder of the period sub-therapeutic halquinol dose (20 mg / kg) for the PC treatment and a sub-therapeutic dose (30 mg / kg) of the blend for the EO treatment. In the first ten days of the growth and finishing phases, a therapeutic dose (45 mg / kg) of tylosin was provided for the PC treatment and a therapeutic dose (40 mg / kg) of the blend for the EO treatment and, considering the remainder of the periods, a subtherapeutic dose of enramycin for PC control in growth (12.5 mg / kg) and finishing (6.3 mg / kg) and a subtherapeutic dose (20 mg / kg) of the blend for the EO treatment. On days 1,2 and 3 of the experiment, all piglets were challenged with *E. coli* K88 + (1mL each day, 10^7 CFU / ml). Two days before being transferred to the growing and finishing facility, the animals were subjected to heat stress (average 31.8°C at day one and 31.7°C at day two). The Tukey test was used to compare the means. There was no treatment effect on growth performance during the nursery phase ($P > 0.05$). The incidence of diarrhea was lower in PC pigs from 0 to 7 days ($P < 0.05$) and decreased in EO pigs from 14 to 28 days ($P < 0.05$). Intestinal morphology, microbial counting, production of volatile fatty acids, antioxidant activity and intestinal gene expression were not influenced by treatments. There was no significant effect for TNF- α on the days evaluated, while IL-10 was lower in the EO pigs than in PC pigs at day 3 after challenge and lower than NC at day 10 ($P < 0.05$). Higher daily weight gain and daily feed intake were observed during the therapeutic dosing at the termination phase compared to NC ($P < 0.05$). These results suggest that the therapeutic dose of EO has a beneficial effect on animal performance compared to antibiotics and attenuates the inflammatory response, being a possible substitute for antibiotic use programs.

Keywords: Additive; Immunity; Performance; Piglet.

1. INTRODUÇÃO

O desmame realizado comumente entre a terceira e quarta semana de vida dos leitões é considerado como um dos períodos mais críticos dentro do sistema de produção de suínos. Ao serem desmamados, fatores estressantes como a separação da mãe, transporte, mudança de instalação, dieta e mistura de leitegadas comprometem a saúde e desempenho desses animais (CAMPBELL et al., 2013; SUTHERLAND et al., 2014).

A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é o principal agente infeccioso causador da diarreia, responsável pela mortalidade de leitões nas primeiras semanas após o desmame e é considerado o agente infeccioso que mais afetam a economia do sistema de produção (MALKEBEEK et al., 2013).

Os fatores de virulência da ETEC estão relacionados a adesão às microvilosidades dos enterócitos no intestino delgado e a produção de enterotoxinas que induzem alterações funcionais nestas células (NAGY & FEKET, 1999). A adesão ocorre através de adesinas fimbriais e as mais comumente encontradas são as do tipo F4 (previamente conhecida como K88) e F18 (LUPPI et al., 2016).

Os antibióticos são comumente utilizados na suinocultura para reduzir a diarreia e melhorar o desempenho dos leitões desmamados. De maneira geral, são utilizados em doses sub-terapêuticas na maioria das fases de produção (GONG et al., 2014). No entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos tem causado preocupações quanto a saúde pública e dos animais pela presença de resíduos de antibiótico em produtos de origem animal e o desenvolvimento e propagação de cepas resistentes (THACKER, 2013; CAO et al., 2019).

Restrições quanto ao uso dos antibióticos melhoradores de desempenho têm sido feitas ao longo dos anos em diferentes países. No ano 2006, a União Europeia banuiu o uso desses medicamentos para essa finalidade (HUANG et al., 2015). No Brasil, algumas moléculas já foram proibidas nas últimas décadas incluindo o sulfato de colistina e a tilosina (BRASIL, 2018). Encontrar uma nova alternativa eficaz aos antibióticos é um desafio na produção de suínos, especialmente na fase de desmame e que possa ser economicamente viável para garantir a sustentabilidade da produção (OMONIJO et al., 2018).

Embora representem o grupo de extratos vegetais mais pesquisados na produção animal, os óleos essenciais são considerados como uma nova classe de aditivos comparado a outras alternativas como ácidos orgânicos, probióticos e prebiótico. Seus constituintes químicos possuem suas próprias características de atividade e efeitos biológicos. Isso significa que os

óleos essenciais possuem um caráter complexo, com efeitos bastante diversos (ZENG et al., 2015).

Na suinocultura, a suplementação de rações com diferentes óleos essenciais tem se mostrado eficiente em melhorar o desempenho, o potencial antioxidante, a modulação da microbiota e o sistema imune, além de reduzir a incidência de diarreia de leitões (ZOU et al., 2016, LIU et al., 2017; YANG et al., 2018). Para suínos em crescimento e terminação, existem trabalhos que descrevem a utilização de óleos essenciais nesta fase (YAN et al., 2010; CULLEN et al., 2005).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de um *blend* de óleos essenciais em doses terapêuticas e subterapêuticas em substituição ao programa de uso de antibióticos através da incidência de diarreia, morfologia e barreira intestinal, atividade antioxidante, população microbiana, produção de ácidos graxos voláteis do intestino, bem como a resposta imune e desempenho de leitões na fase de creche e o desempenho e diarreia dos suínos nas fases de crescimento e terminação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Comissão de Ética no Uso de Animais

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Lavras, protocolo nº 012/2018.

2.2 Local

O estudo foi conduzido no Centro Experimental de Suínos – CES, localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - Minas Gerais.

2.3 Animais e instalações

Foram utilizados 108 leitões machos castrados (cruzamento de fêmeas DanBred - DB90 x machos PIC - AGPIC337), obtidos a partir de um rebanho suíno comercial. Os leitões foram desmamados aos 23 dias de idade, com uma média de 6,3 kg ($\pm 0,44$ kg) de peso vivo e alojados na unidade de creche composta de baias suspensas (1,5 m x 1,5 m), piso ripado, com comedouros tipo calha e bebedouros do tipo chupeta. A temperatura foi controlada pela abertura ou fechamento de janelas e uso de lâmpadas aquecedoras para manter o ambiente próximo ao adequado para a idade do animal. Após o período de creche, os suínos foram alojados na unidade de crescimento/terminação composta de baias de piso compacto (3,0 m x 1,5 m), com comedouros semiautomáticos e bebedouros tipo chupeta.

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três tratamentos e nove repetições. Foram utilizadas seis repetições para avaliar a resposta imunológica e oito repetições para avaliar o desempenho e as demais variáveis. A unidade experimental foi composta de quatro leitões na creche e dois suínos no crescimento e terminação. O peso inicial foi utilizado como fator bloco e a unidade experimental representada pela baia.

2.5 Tratamentos e dietas experimentais

Os tratamentos experimentais foram divididos em duas fases. Na creche, uma fase com dose terapêutica nos primeiros sete dias e uma fase com dose subterapêutica, considerando o restante do período. Na fase de crescimento e terminação, a fase terapêutica correspondeu aos dez primeiros dias de cada fase e a subterapêutica correspondeu ao restante do período. O tratamento controle negativo (CN) não teve a inclusão de nenhum aditivo à dieta basal. O tratamento controle positivo (CP) teve a inclusão de antibióticos e o tratamento óleos essenciais (OE), a inclusão de um *blend* de óleos essenciais microencapsulados composto por 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol. Na fase de creche foi utilizado a gentamicina em dose terapêutica (270 mg/kg) e o halquinol em dose subterapêutica (20 mg/kg).

Os óleos essenciais foram incluídos com o mesmo propósito na primeira semana como dose terapêutica (40 mg/kg) e como dose subterapêutica (30 mg/kg). Na fase de crescimento e terminação foi utilizado a tilosina em dose terapêutica (45 mg/kg) e a enramicina em dose subterapêutica (12,5 mg/kg no crescimento; 6,3 mg/kg na terminação). Os óleos essenciais foram incluídos como dose terapêutica (40 mg/kg) e como dose subterapêutica (20 mg/kg) para essas fases (Tabela 1).

Tabela 1 - Inclusão dos aditivos experimentais nas fases de creche, crescimento e terminação

Tratamento	Creche			Crescimento/Terminação		
	Gentamicina	Halquinol	<i>Blend</i>	Tilosina	Enramicina	<i>Blend</i>
CP	270 mg/kg	20 mg/kg	0	45 mg/kg	12,5 mg/kg C 6,3 mg/kg T	0
CN	0	0	0	0	0	0
OE	0	0	40 mg/kg 30 mg/kg	0	0	40 mg/kg 20 mg/kg

Blend: 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol; C: dosagem da enramicina na fase de crescimento; T: dosagem da enramicina na fase de terminação

As rações foram formuladas para atender ou exceder as exigências de cada fase segundo Rostagno et al. (2017) em quatro períodos na fase de creche pré-inicial I, pré-inicial II, inicial I, inicial II (Tabela 2) e um período nas fases de crescimento e terminação (Tabela 3).

Tabela 2 – Composição das dietas experimentais da fase de creche

Descrição	Pré-I	Pré-II	Inicial-I	Inicial-II
Milho 7,88%	32,463	40,445	50,048	66,750
Soja integral micronizada	1,952	1,614	4,348	-
Milho Pré-cozido	11,782	11,232	6,234	-
Farelo de soja 45%	14,000	16,000	22,000	28,541
Sangue de hemáceas	0,500	0,750	0,750	-
Plama Spray Dried	5,000	3,000	1,500	-
Prius L70 ¹	20,000	14,000	6,000	-
Start Pro 20 ²	7,000	5,000	-	-
Óleo de soja	-	0,106	2,293	1,111
Premix Mineral ³ e Vitamínico ⁴	0,150	0,150	0,150	0,150
Fitase 10.000 FTU	0,005	0,005	0,005	0,005
Antioxidante	0,030	0,030	0,030	0,020
Extrato de Levedura	2,000	2,000	1,500	-
Aromatizante	0,050	0,050	0,050	0,025
Fosfato bicálcico 18,5%	0,544	0,810	1,037	0,920
Calcário calcítico	0,945	1,375	1,168	0,875
Sal comum	0,150	0,200	0,350	0,453
L-Lisina HCL	0,637	0,592	0,504	0,355
DL-Metionina 98,5%	0,335	0,279	0,246	0,115
L-Treonina 94,9%	0,370	0,335	0,243	0,118
L-Triptofano 99,0%	0,094	0,084	0,050	0,017
L-Valina 96,5%	0,200	0,194	0,102	-
Cloreto de Colina 60%	0,100	0,100	0,100	0,013
Caulim*	1,669	1,624	1,268	0,508
Palatabilizante	0,025	0,025	0,025	0,025
Valores calculados	Pré-I	Pré-II	Inicial-I	Inicial-II
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3504	3400	3375	3250
Proteína bruta (%)	19,255	18,240	19,171	18,166
Lisina digestível (%)	1,720	1,582	1,377	1,120
Metionina digestível (%)	0,568	0,509	0,498	0,367
Metionina + cistina digestível (%)	0,928	0,829	0,796	0,638
Treonina digestível (%)	1,058	0,972	0,902	0,728
Triptofano digestível (%)	0,298	0,276	0,257	0,213
Lactose (%)	16,835	11,825	4,200	-
Cálcio total (%)	0,888	1,068	0,973	0,794
Fósforo disponível (%)	0,550	0,528	0,481	0,393
Sódio	0,368	0,295	0,239	0,199

* Os tratamentos se diferem pelo nível de inclusão de cada aditivo em substituição ao caulim. ¹Produto comercial com 70,50% de lactose. ²Produto comercial com 40,00% de lactose. ³Premix vitamínico contendo por kg de produto: Vitamina A: 28.500.000 UI; Vitamina D3: 5.800.000 UI; Vitamina E: 160.000 UI; Vitamina K3: 6.000 mg; Vitamina B1: 5.400 mg; Vitamina B2: 12 g; Vitamina B6: 7.000 mg; Vitamina B12: 70.000 mcg; Niacina: 75g; Ácido Pantotênico: 45 g; Ácido fólico: 7.000 mg; Biotina 850 mg. ⁴Premix mineral contendo por kg de produto: Manganês 48.000 mg; Ferro: 90.00 mg; Cobre: 14.400 mg; Zinco: 109.366 mg; Selênio: 450 mg; Iodo: 1.240 mg; Cálcio total: 12,5%.

Tabela 3 – Composição de dietas experimentais da fase de crescimento e terminação

Descrição	Crescimento	Terminação
Milho 7,88%	70,816	76,704
Farelo de soja 45%	23,591	16,397
Óleo de soja	2,562	4,454
Premix Vitamínico ¹ e Mineral ²	0,150	0,120
Fitase 10.000 FTU	0,005	0,005
Antioxidante	0,015	0,015
Fosfato bicálcico 18,5%	0,566	0,228
Calcário calcítico	0,751	0,628
Sal comum	0,413	0,411
L-Lisina HCL	0,350	0,332
DL-Metionina 98,5%	0,112	0,082
L-Treonina 94,9%	0,105	0,083
L-Triptofano 99,0%	0,029	0,031
Cloreto de Colina 60%	0,050	0,025
Caulim*	0,485	0,485
Valores calculados	Crescimento	Terminação
Energia Met. Suínos (kcal/kg)	3350	3350
Proteína bruta (%)	16,248	13,168
Lisina digestível (%)	0,998	0,805
Metionina digestível (%)	0,341	0,275
Metionina + Cistina digestível (%)	0,589	0,483
Treonina digestível (%)	0,649	0,523
Triptofano digestível (%)	0,199	0,161
Cálcio total (%)	0,648	0,497
Fósforo disponível (%)	0,319	0,242
Sódio	0,183	0,165

* Os tratamentos se diferem pelo nível de inclusão de cada aditivo em substituição ao caulim. ¹Premix vitamínico contendo por kg de produto: Vitamina A: 16.500.000 UI; Vitamina D3: 5.000.000 UI; Vitamina E: 65.000 UI; Vitamina K3: 5.500 mg; Vitamina B1: 3.000 mg; Vitamina B2: 8.000 mg; Vitamina B6: 5.500 mg; Vitamina B12: 45.000 mcg; Niacina: 45g; Ácido Pantotênico: 33 g; Ácido fólico: 1.800 mg; Biotina 220 mg. ⁴Premix mineral contendo por kg de produto: Manganês 48.000 mg; Ferro: 90.00 mg; Cobre: 14.400 mg; Zinco: 109.366 mg; Selênio: 450 mg; Iodo: 1.240 mg; Cálcio total: 12,5%.

2.6 Procedimentos experimentais

O período experimental de 127 dias foi dividido em seis períodos, quatro na creche, ou seja, pré-inicial I (1 a 7 dias), pré-inicial II (8 a 14 dias), inicial I (15 a 28 dias) e inicial II (29 a 42 dias), e os outros dois em crescimento (43 a 87 dias) e terminação (88 a 127 dias).

Os animais foram alimentados *ad libitum* até o final do experimento. Para o controle de doenças respiratórias, todos os animais receberam, no primeiro dia experimental e na saída de creche, uma dose 0,15 mL e 0,6 mL respectivamente, de antibiótico a base de tultatromicina (Draxxin[®], Zoetis) via intramuscular. Por concentrar-se apenas no pulmão, a tultatromicina não apresenta nenhuma ação sobre o desafio intestinal, dando mais confiabilidade aos resultados do estudo.

Para a monitoria da temperatura e umidade relativa na fase de creche, foi utilizado um termômetro de globo negro, mantidos em uma baia vazia a uma altura correspondente à meia altura dos animais. A temperatura foi controlada através do manejo de janelas e do uso de lâmpadas de aquecimento.

Nos dias 1, 2 e 3 do experimento, todos os leitões receberam oralmente 1 mL/dia de solução contendo 10^7 UFC/ml de *Escherichia coli* enterotoxigênica K88⁺ (LT⁺, STa⁺ e STb⁺) proveniente do Laboratório de Sanidade Suína - VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). O inóculo foi preparado no laboratório de Microbiologia do Departamento de Zootecnia da UFLA a partir do cultivo em meio de cultura (Luria Bertani Broth, Kasvi) durante 16 horas, a 37 °C seguido de diluição seriada em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) até a concentração final de 10^7 UFC/ml.

No terceiro e décimo dia de experimento, foram colhidas amostras de sangue do animal com o peso vivo mais próximo da média da baia, de seis repetições de cada tratamento, totalizando 18 animais. As amostras foram colhidas em tubos sem anticoagulante para a separação do soro sanguíneo visando a avaliação do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) como marcador pró-inflamatório e Interleucina-10 (IL-10) como marcador anti-inflamatório.

Para analisar as demais variáveis, foram utilizadas oito repetições de cada tratamento, totalizando 24 animais. Os animais foram eutanasiados no décimo dia experimental. A eutanásia foi realizada através de eletronarcose (> 300 V, 1,25 A, de 6 segundos) seguido por exsanguinação, no Setor de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

O animal escolhido de cada repetição tinha o peso vivo mais próximo da média da baia. A escolha das repetições foi determinada na exclusão de uma repetição considerada leve, intermediária e pesada em relação ao peso dos animais para a resposta imunológica e a repetição intermediária em relação ao peso foi excluída para as demais variáveis.

Nos dois últimos dias que antecederam a fase de crescimento, todos os animais foram submetidos a um estresse por calor na instalação de creche. O estresse foi promovido utilizando as lâmpadas infravermelho acesas e janelas fechadas durante 5 horas, no intervalo de 11 horas da manhã até as 16 horas da tarde. Os dados de temperatura e umidade durante o período foram registrados a cada 15 minutos, totalizando 11 observações por dia (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 - Registro da temperatura e umidade no primeiro dia de estresse por calor

Hora	T°C		Umidade (%)	
	Sala 1	Sala 2	Sala 1	Sala 2
11:00	29,1	29,2	88	45
11:45	30,4	30,5	88	45
12:15	31,0	31,1	89	46
12:45	31,6	31,7	91	45
13:15	31,9	32,0	91	45
13:45	31,9	32,0	91	46
14:15	31,7	32,2	93	46
14:45	32,2	32,5	94	46
15:15	32,5	32,6	94	46
15:45	32,6	32,8	94	46
16:00	32,7	32,7	94	46

Tabela 5 - Registro da temperatura e umidade no segundo dia de estresse por calor

Hora	T°C		Umidade (%)	
	Sala 1	Sala 2	Sala 1	Sala 2
11:00	26,8	26,8	70	44
11:45	30,3	30,9	88	46
12:15	31,2	31,7	89	46
12:45	31,9	32,2	89	46
13:15	32,2	32,4	89	47
13:45	32,5	32,8	91	47
14:15	33,0	33,0	92	46
14:45	33,1	33,2	92	46
15:15	33,2	33,4	93	47
15:45	33,0	33,3	94	47
16:00	32,0	33,3	94	47

2.7 Desempenho e incidência de diarreia

Os animais foram pesados nos dias 1, 7, 14, 28, 42, 52, 87, 97 e 127 e a ração fornecida e as sobras foram avaliadas diariamente. Com base nesses dados, foram calculados o ganho de peso diário (GPD), o consumo de ração diário (CRD) e conversão alimentar (CA) para cada fase.

Duas vezes ao dia, durante todo o experimento, foi observada a presença ou ausência de diarreia na baia e calculada a incidência em porcentagem relacionada aos dias de estudo. Seguindo a metodologia de Casey et al. (2007), a ausência de diarreia foi determinada pela observação de fezes normais e a presença de diarreia pela observação de fezes líquidas e pastosas.

2.8 Avaliação da morfologia intestinal

Foram coletados segmentos de aproximadamente 2 cm do jejuno para a avaliação da morfologia intestinal. Após a remoção do conteúdo luminal, as amostras foram previamente lavadas com solução fisiológica e fixada em formol 10% durante 24 horas e transferidas para solução em álcool 70% até a fabricação das lâminas. O tecido foi desidratado, incluído em bloco de parafina, cortado em micrótomo na espessura de 4µm e corado por coloração de hematoxilina e eosina, segundo Luna (1968).

O jejuno foi amostrado por corte com dez vilosidades para avaliação de altura de vilosidade e dez criptas para profundidade de cripta e a relação entre essas medidas. A análise das lâminas histológicas foi feita no Laboratório de Histologia e Enzimologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. As lâminas foram fotografadas através de microscópio óptico (CX31, Olympus do Brasil Ltda., São Paulo, SP) e câmera de capturas digitais (SC30, Olympus do Brasil Ltda., São Paulo, SP). A altura das vilosidades e profundidade das criptas foram medidas através do *software* analisador de imagens Image J 1.41.

2.9 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi realizada através da amostragem de conteúdo cecal dos leitões. As amostras foram diluídas em glicerol 20% e congeladas a -20°C até a execução das análises. A contagem bacteriana foi realizada por meio da técnica de contagem em placas. O conteúdo total coletado foi homogeneizado e uma alíquota de um ml foi diluído em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para a diluição seriada de 10⁻¹ a 10⁻⁹. Após a diluição foi realizado o plaqueamento em duplicata e após a incubação foi feito a contagem de colônias de *Escherichia coli* (agar MacConkey, Kasvi), *Lactobacillus* spp (agar MRS, Kasvi) e *Bifidobacterium* (agar BSM, Sigma Aldrich, câmara de anaerobiose). Todas as placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 37°C. As contagens de colônias (UFC/g) foram submetidas à transformação logarítmica (log₁₀) antes da análise estatística. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, baseado em Wang et al. (2011).

2.10 Análise de ácidos graxos voláteis

Para a determinação de ácido acético, propiônico e butírico, 1g do conteúdo cecal amostrado foi pesado em microtubo e adicionado 1ml de água destilada. Na sequência, a solução foi homogeneizada em agitador de tubos e centrifugada a 15.000 g durante 60 minutos, a 4°C. Posteriormente, o extrato sobrenadante ($\pm 0,4$ ml) de cada amostra foi transferido para vials cromatográficos, nos quais foram adicionados 100 μ L de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 50 μ L de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM.

Desse extrato, foi injetado automaticamente pelo sistema injetor, 1 μ L em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) equipado com coluna capilar HP-FFAP (1909F-112; 25 m; 0,32 mm; 0,5 μ m; JeW Agilent Technologies). O gás de arraste utilizado foi o H₂, mantido em fluxo de 31,35 mL/min. A temperatura do injetor e detector foi de 260°C. O tempo total da análise cromatográfica foi de 16 minutos e meio, dividido em três rampas de aquecimento: 80°C (1min), 120°C (20°C/min; 3min) e 205°C (10°C/min; 2 min). A concentração dos ácidos (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa (FERREIRA et al.,2016). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ da Universidade Federal de São Paulo (USP).

2.11 Análise das enzimas antioxidantes

Para avaliação das enzimas antioxidantes, segmentos de aproximadamente 2 cm do jejuno foram amostrados, previamente lavados com solução fisiológica, e armazenados em nitrogênio líquido até serem conservadas em -80°C para posterior análise. As análises foram realizadas no Laboratório Imunova – Análises Biológicas, Curitiba/PR.

Catalase

Para análise bioquímica da catalase, as amostras foram homogeneizadas em solução tampão fosfato de potássio pH 6,5, a uma diluição de 1:10, e centrifugadas a velocidade de 10000 g durante 20 minutos sob uma temperatura de 4°C. A atividade da catalase foi quantificada de acordo com Aebi (1984). A reação foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) na presença da proteína citosólica, e monitorizada por 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro, utilizando o coeficiente de extinção de 41 mmolar⁻¹cm⁻¹.

Superóxido-dismutase (SOD)

Para as análises da SOD as amostras foram homogeneizadas em solução tampão fosfato de potássio pH 6,5, a uma diluição de 1:10, e centrifugadas a velocidade de 10000 g durante 20 minutos sob uma temperatura de 4°C. A atividade desta enzima foi quantificada através da capacidade da SOD presente no tecido em inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol (Gao et al., 1998). Para isso, 60 µL de cada amostra homogeneizada foi adicionada em uma solução contendo 1327,5 µL de tampão Tris HCl (0,4M, pH 8,9), logo após agitadas em vórtex e adicionada a 75 µL de solução com pirogalol 15 mM. Após incubação de 30 minutos, em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 37,5 µL de solução de HCl a 1N. A leitura foi feita em seguida em leitor de microplaca a 440 nm. A quantidade de enzima que inibiu a reação em 50% (IC50) foi definida como uma unidade de SOD, e a atividade da enzima expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína total (U SOD.mg proteína-1).

Glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram medidos pela técnica de Sedlak & Lindsay (1968). As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 6,5) em diluição 1:10. Subsequentemente, 100 µL do homogenato foram misturados a ácido tricloroacético (80 µL, grau de pureza 12.5%). O sobrenadante foi separado por centrifugação a 6000 rpm, durante 15 min a 4°C. Em seguida, 20 µL do sobrenadante foram misturados a 280 µL de tampão Tris HCl (0,4 M, pH 8,9) e 5 µL de ácido 5,5'-ditiobi-2-nitrobenzóico em metanol. A absorbância da solução foi medida em 415 nm em leitor de microplacas, usando GSH conhecido como padrão externo.

Concentração proteica

A quantificação de proteínas nas amostras foi feita em microplacas, segundo Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão. Foram utilizados 10 µL da amostra (homogeneizadas em tampão fosfato de potássio, pH 6,5, centrifugadas em 10000 x g, sob temperatura de 4°C, durante 20 minutos, diluídas 1:10) em cada poço da microplaca, que reagiram com 250 µL de solução de Bradford. A leitura foi realizada em leitor de microplaca, a 595 nm. O valor encontrado de proteínas foi utilizado para o cálculo dos parâmetros anteriores, expressos em mg de proteína.

2.12 Análise imunológica: quantificação de citocinas no soro

Foram colhidos 5 ml de sangue via veia jugular em frascos sem anticoagulante para avaliar a concentração sérica do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e Interleucina-10 (IL-10). O sangue colhido foi armazenado por oito horas a 4°C para a retirada do soro que foi pipetado em microtubos e congelado a -20° até o momento da análise. A concentração foi quantificada utilizando kit ELISA (*Porcine Tumor Necrosis Factor α* ELISA Kit, Sigma Aldrich, Missouri, EUA; Interleukin-10 Sandwich ELISA Kit, FineTest, Wuhan, China) específico para suíno, de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi registrada a 450 nm utilizando um leitor de 168 placas ELISA (Multiskan GO Espectrofotômetro para Microplacas, ThermoScientific, Vantaa, Finland) e cada amostra foi testada em duplicata. As análises foram conduzidas no Laboratório de Enzimologia e Imunohistoquímica, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

2.13 Avaliação da permeabilidade intestinal

Para avaliar a permeabilidade da mucosa intestinal, foi analisado a expressão gênica da ocludina e GLP-2 (*Glucagon-like Peptide 2*). Para isso, foi coletada segmentos de aproximadamente 2 cm de jejuno, previamente lavados com solução fisiológica e armazenada em nitrogênio líquido até serem conservadas em -80°C para posteriores análises de PCR em tempo real.

O RNA total foi extraído das amostras de jejuno utilizando o Sistema de Isolamento de RNA Total SV, de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA, utilizou-se 1 μ g de RNA total conforme descrito no protocolo do sistema de isolamento reverso GoScript (Promega, Madison, WI).

Os *primers* alvo para ocludina tinham sequência direta 5'-GCAGCAGTGGTAACTTGGA-3' e sequência reversa 5'-GTCGTGTAGTCTGTCTCGTAATG-3' e os *primers* alvo para GLP-2 tinham sequência direta 5'-CCAGGATTTTGTGCAGTGGC-3' e sequência reversa 5'-TCCTCTGGGAAATCTCGCCT-3'. O delineamento dos iniciadores alvo e de referência foi realizado utilizando sequências registradas e publicadas no banco de dados públicos GenBank. Para a caracterização gênica, os quadros abertos de leitura (ORF) das sequências selecionadas foram obtidos utilizando a ferramenta ORFinder e as sequências das proteínas codificadas foram obtidas utilizando-se a ferramenta *translate* do banco de proteínas ExPASy. Os *primers* foram projetados utilizando o software Primer 3 e sintetizados (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

com suas sequências. O RNA total foi extraído das amostras de jejuno usando QIAzol (QIAGEN, Valencia, CA) e tratado com DNAase livre de DNA (Ambion, Austin, TX) de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração e a qualidade do RNA foram quantificadas usando um espectrofotômetro (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE). Para verificação da integridade do RNA total, as bandas estruturais de 28 e 18 s de rRNA foram utilizadas como marcadores em gel de agarose a 1,0% (m / v) submetidas à eletroforese. Para a síntese de ADNc, utilizou-se 1 de ARN total como descrito no protocolo do kit de transcrição inversa HighCapacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Curvas padrão foram geradas para os genes estudados com as seguintes diluições: 1: 5, 1:25, 1: 125, 1: 625 e 1: 3125, seguido de diluição de cada cDNA usando água purificada em uma concentração de 1: 5. Para as reações quantitativas de RT-PCR, 3,4 µL de água, 0,3 µL de primer direto e reverse primer (10 µM de concentração inicial e 0,3 µM de concentração final) e 5 µL do SYBER Green Kit. As reações foram preparadas pela adição de 9 µL da mistura em cada poço da placa, seguido por 1 µL de cDNA em cada reação. As placas foram centrifugadas a 700 xg por 20 segundos e o equipamento utilizado para as análises foi o Mastercycler eplex (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As condições de amplificação foram: 50 durante 2 min, 95 durante 10 min, 40 ciclos de 95 durante 15 s, 60 durante 1 min e 95 durante 15 s. As análises de RT-qPCR para cada gene estudado foram realizadas usando cDNAs com 3 réplicas técnicas por réplica biológica. Os resultados foram normalizados usando o método do ciclo limite para a expressão do gene de referência RPL-32 (Proteína Ribossomal L32) (sequência direta: 5'-CAA AATTAAGCGGA ACTGGCGG-3' e sequência reversa: 5'-GCACATTAGCAGCACTTCAAGC-3').

No final da reação, a curva de fusão foi determinada para cada gene entre as temperaturas de 75 ° C a 95 ° C. Toda a experiência de PCR em tempo real incluiu uma amostra como um controle negativo (sem cDNA) e um calibrador, que foi a amplificação de um gene conhecido (RPL-32) a partir de uma alíquota do conjunto de cDNA das amostras. Os resultados da expressão gênica foram gerados e registrados como valores de CT (Cycle Threshold). Os níveis relativos de expressão foram calculados de acordo com o método descrito por Pfaffl (2001), que é baseado em valores de CT que são corrigidos para a eficiência de amplificação para cada par de *primers*. As análises foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

2.14 Análise estatística

O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e, quando estes não apresentaram essa distribuição, foi realizada a transformação usando PROCRAK (SAS INSTITUTE INC, 2009). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância, exceto a incidência de diarreia. Quando houve diferença estatística pelo teste F ($F < 0,05$), foi adotado o teste de Tukey para comparação das médias, considerando diferença significativa o P -valor $< 0,05$ e tendência $0,05 \leq P\text{-valor} < 0,10$. Na variável incidência de diarreia, foi analisada a influência de cada tratamento na ocorrência de diarreia, através da aplicação do modelo linear generalizado binomial no procedimento GENMOD. Os valores de expressão gênica foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Steibel et al (2009).

3. RESULTADOS

Desempenho dos leitões na fase de creche

Tabela 6 - Efeito das dietas experimentais sobre ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e peso final em leitões desafiados com E.coli K88+

Variável	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
Peso Inicial	6,318	6,316	6,315	7,017	0,085	1,000
0 a 7 dias						
Peso final, kg	7,661	7,578	7,495	6,354	0,096	0,529
GPD, kg	0,180	0,189	0,168	13,263	0,005	0,203
CRD, kg	0,206	0,210	0,202	8,752	0,004	0,670
CA	1,182	1,095	1,180	10,233	0,024	0,232
7 a 14 dias						
Peso final, kg	9,542	9,825	9,627	6,630	0,126	0,368
GPD, kg	0,294	0,302	0,315	9,570	0,006	0,345
CRD, kg	0,395	0,371	0,376	11,075	0,008	0,449
CA	1,374	1,268	1,251	13,176	0,034	0,280
14 a 28 dias						
Peso final, kg	15,567	16,121	15,779	7,413	0,226	0,385
GPD, kg	0,447	0,450	0,439	10,890	0,009	0,890
CRD, kg	0,678	0,665	0,680	14,277	0,020	0,947
CA	1,471	1,496	1,536	4,992	0,016	0,244
28 a 42 dias						
Peso final, kg	24,266	24,538	24,147	5,803	0,277	0,814
GPD, kg	0,593	0,603	0,614	4,580	0,006	0,353
CRD, kg	1,077	1,128	1,112	6,112	0,015	0,414
CA	1,867	1,865	1,826	5,863	0,024	0,669
0 a 42 dias						
GP, kg	17,961	18,591	18,167	5,536	0,206	0,439
GPD, kg	0,391	0,411	0,405	6,419	0,005	0,313
CRD, kg	0,668	0,710	0,700	8,873	0,013	0,438
CA	1,764	1,728	1,730	7,538	0,029	0,866

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis de desempenho durante o período de creche.

Desempenho dos suínos na fase de crescimento e terminação

Tabela 7 - Efeito das dietas experimentais sobre ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e peso final em suínos na fase de crescimento

Variável	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
42 a 52 dias						
Peso final, kg	30,663	31,286	32,025	5,433	0,355	0,316
GPD, kg	0,706	0,630	0,734	19,381	0,028	0,318
CRD, kg	1,448	1,462	1,548	6,872	0,022	0,165
CA	2,064	2,192	2,145	19,608	0,084	0,833
52 a 87 dias						
Peso final, kg	66,400	68,750	69,875	4,679	0,653	0,215
GPD, kg	1,037	1,095	1,082	7,123	0,015	0,232
CRD, kg	2,285	2,418	2,393	6,116	0,029	0,123
CA	2,203	2,162	2,165	4,358	0,019	0,663
42 a 87 dias						
GPD, kg	1,223	1,266	1,303	6,371	0,016	0,123
CRD, kg	2,716	2,855	2,853	6,332	0,036	0,179
CA	2,175	2,191	2,201	5,354	0,023	0,899
0 a 87 dias						
GP, kg	60,058	62,409	63,479	5,143	0,651	0,079
GPD, kg	0,684	0,707	0,713	6,508	0,009	0,383
CRD, kg	1,434	1,495	1,475	5,956	0,018	0,373
CA	2,062	2,041	2,030	5,440	0,022	0,872

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (tilosina 42-52d 45 mg/kg e enramicina; 52-87d 12,5 mg/kg; OE= óleos essenciais (42-52d 40 mg/kg; 52-87d 20 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Considerando o período de 0 a 87 dias, foi possível observar uma tendência (P=0,07) para o maior ganho de peso dos animais que receberam dieta suplementada com óleos essenciais em relação ao CN.

Tabela 8 - Efeito das dietas experimentais sobre ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e peso final em suínos na fase de terminação*

Variável	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
87 a 97 dias						
Peso final, kg	77,494	79,244	81,100	5,286	0,821	0,215
GPD, kg	0,896 B	0,914 B	1,063 A	13,719	0,026	0,014
CRD, kg	3,178 B	3,451 A	3,498 A	6,855	0,048	0,004
CA	3,499	3,443	3,172	11,537	0,081	0,222
97 a 127 dias						
Peso final, kg	115,089	115,467	119,825	4,667	1,068	0,110
GPD, kg	1,343	1,324	1,366	8,530	0,023	0,777
CRD, kg	5,001	5,112	5,176	3,829	0,042	0,245
CA	3,640	3,962	3,718	8,091	0,059	0,067
87 a 127 dias						
GPD, kg	1,243	1,194	1,266	6,413	0,016	0,181
CRD, kg	4,315 B	4,531 AB	4,613 A	5,713	0,051	0,034
CA	3,559	3,737	3,563	6,449	0,046	0,216
0 a 127 dias						
GP, kg	108,771	109,151	113,429	5,023	1,087	0,111
GPD, kg	0,849	0,859	0,889	5,203	0,009	0,111
CRD, kg	2,310	2,389	2,446	5,610	0,026	0,108
CA	2,722	2,761	2,701	3,310	0,018	0,443

*Médias na linha, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (tilosina 87-97d 45 mg/kg e enramicina 97-127d 6,3 mg/kg); OE= óleos essenciais (87-97d 40 mg/kg; 97-127d 20 mg/kg kg/ton; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Nos dez primeiros dias da fase de terminação, os animais do tratamento OE apresentaram maior ganho de peso diário comparado aos do CP e CN ($P < 0,05$) e maior consumo de ração diário comparado ao CN ($P < 0,05$).

Considerando o período de 87 a 127 dias, os animais do tratamento OE apresentaram maior consumo de ração diário comparado ao do CN ($P < 0,05$).

Incidência de diarreia

Tabela 9 - Efeito das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia em suínos desafiados com *E. coli* K88+ na fase de creche, crescimento e terminação*

Incidência de diarreia (%)	Tratamentos ¹			P-valor
	CN	CP	OE	
Creche, dias				
0 a 7	72,2 A	38,1 B	82,5 A	< 0,001
7 a 14	26,2	23,8	23,8	0,880
14 a 28	39,7 A	39,3 A	22,2 B	< 0,001
28 a 42	31,7 B	41,7 A	33,3 AB	0,045
0 a 42	40,2	37,3	36,2	0,259
Crescimento, dias				
42 a 52	8,8 A	6,6 A	2,2 B	0,004
52 a 87	11,1 C	1,7 B	2,4 A	< 0,001
42 a 87	9,6 C	1,4 B	2,1 A	< 0,001
Terminação, dias				
87 a 97	7,8	8,3	7,8	0,975
97 a 126	1,1 B	3,9 A	6,5 A	< 0,001
87 a 126	2,8 B	5,0 A	6,8 A	0,001

*Médias na linha, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo na creche (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeido, capsaicina, anetol e cineol). CP= controle positivo no crescimento (tilosina 42-52d 45 mg/kg e enramicina 52-87d 12, g mg/kg); OE= óleos essenciais no crescimento (42-52d 40 mg/kg; 52-87d 20 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeido, capsaicina, anetol e cineol); CP na terminação= controle positivo (tilosina 87-97d 45 mg/kg e enramicina 97-127d 6,3 mg/kg); OE= óleos essenciais na terminação (87-97d 40 mg/kg; 97-127d 20 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeido, capsaicina, anetol e cineol).

Durante a primeira semana da fase de creche, o tratamento CP apresentou menor incidência de diarreia comparado ao CN e OE ($P < 0,05$). Já na terceira e quarta semana, o tratamento OE apresentou a menor incidência comparado ao CN e CP. Nas duas últimas semanas dessa fase, o CP apresentou maior incidência de diarreia comparado ao CN ($P < 0,05$).

Na fase de crescimento, o tratamento OE apresentou menor incidência nos dez primeiros dias, comparado aos tratamentos CN e CP ($P < 0,05$). Considerando o período total de crescimento, o CP apresentou menor incidência comparado ao CN e OE ($P < 0,05$). Na fase de terminação, o tratamento CN apresentou menor incidência de diarreia comparado ao CP e OE ($P < 0,05$).

Morfologia intestinal

Tabela 10 - Efeito das dietas experimentais sobre a altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação V:C, em μm , de leitões desafiados *E. coli* K88+

Variável	Tratamentos ¹				EPM	P-valor
	CN	CP	OE	CV(%)		
Altura de vilosidade	463,420	421,492	495,740	15,498	14,868	0,110
Profundidade de cripta	255,647	253,299	259,997	11,870	6,345	0,913
Relação AV:PC	1,876	1,763	1,994	16,889	0,066	0,362

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Como demonstrado na Tabela 10, não houve resultados significativos entre os tratamentos para altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação AV:PC do jejuno dos leitões avaliados.

Análise microbiológica

Tabela 11 - Efeito das dietas experimentais sobre a contagem de *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp* do conteúdo cecal de leitões desafiados com *E. coli* K88+ (log UFC/g)

Log UFC/g	Tratamentos ¹				EPM	P-valor
	CN	CP	OE	CV(%)		
<i>Escherichia coli</i>	4,773	5,120	4,867	23,489	0,420	0,943
<i>Lactobacillus spp</i>	7,315	6,766	7,629	11,312	0,188	0,460
<i>Bifidobacterium spp</i>	6,893	7,030	7,056	11,061	3,259	0,438

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Como demonstrado na Tabela 11, não houve resultados significativos entre os tratamentos para contagem de *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp* do conteúdo cecal dos leitões avaliados.

Ácidos graxos voláteis

Tabela 12 - Efeito das dietas experimentais sobre a produção cecal de ácido graxos voláteis, em mM/g de leitões desafiados com E.coli K88+

mM/g	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
Ácido Acético	70,351	72,036	65,609	13,334	1,972	0,421
Ácido Propiônico	36,371	34,294	37,669	13,838	1,140	0,466
Ácido Butírico	20,767	15,658	15,160	36,099	1,267	0,135
Total	124,407	124,788	116,957	9,540	2,549	0,419

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Como demonstrado na Tabela 12, não houve resultados significativos entre os tratamentos para a produção cecal de ácidos graxos voláteis dos leitões avaliados.

Avaliação das enzimas antioxidantes

Tabela 13 - Efeito das dietas experimentais sobre a atividade antioxidante do jejuno de leitões desafiados com E.coli K88+

Variável	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
Proteína (mg/ml)	0,548	0,678	0,664	34,020	0,046	0,471
GSH (µg/g de tecido)	231,100	190,016	196,331	41,870	18,832	0,661
SOD (U/mg proteína)	2601,100	2535,620	2613,920	39,421	212,254	0,988
CAT (nmol.min-1.mg proteínas-1)	53,427	69,518	71,430	61,592	10,495	0,794

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeído, capsaicina, anetol e cineol).

Como demonstrado na Tabela 13, não houve resultados significativos entre os tratamentos para a produção de enzimas antioxidantes do jejuno dos leitões avaliados.

Expressão gênica

Tabela 14 - Expressão relativa de mRNA dos genes ocludina e GLP-2 do jejuno de leitões desafiados com *E.coli* K88+

Variável	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
Ocludina	1,239	1,215	1,000	74,577	0,196	0,985
GLP-2	1,571	1,000	1,426	83,870	0,248	0,711

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeido, capsaicina, anetol e cineol).

Como demonstrado na Tabela 14, não houve resultados significativos entre os tratamentos para a expressão relativas d mRNA dos genes de ocludina e GLP-2 do jejuno dos leitões avaliados.

Quantificação de citonias inflamatórias (IL-10 e TNF- α)

Tabela 15 - Efeito das dietas experimentais sobre as concentrações de IL-10 e TNF- α (ng/ml) correspondentes ao terceiro e décimo dia experimental*

Variável	Tratamentos ¹			CV(%)	EPM	P-valor
	CN	CP	OE			
Dia 3						
IL-10 (ng/ml)	0,869 AB	1,001 A	0,370 B	61,481	0,112	0,030
TNF-α (ng/ml)	0,027	0,026	0,026	0,074	0,002	0,736
Dia 10						
IL-10 (ng/ml)	0,349 A	0,306 AB	0,195 B	38,937	0,028	0,041
TNF-α (ng/ml)	0,023	0,024	0,024	0,053	0,002	0,277

*Médias na linha, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

¹CN=controle negativo (dieta basal sem adição de nenhum aditivo); CP= controle positivo (gentamicina 0-7d 270 mg/kg e halquinol 8-42 d 20 mg/kg); OE= óleos essenciais (0-7d 40 mg/kg; 8-42d 30 mg/kg; 12% de carvacrol e 6% de cinamaldeido, capsaicina, anetol e cineol).

Ao analisar a concentração de citocinas entre os tratamentos em dois momentos diferentes, não foi observada mudança na concentração de TNF- α . A IL-10 se comportou de maneira diferente entre os tratamentos podendo ser observado uma menor concentração sérica ($P < 0,05$) dos leitões que receberam óleos essenciais. No primeiro dia de coleta, após a inoculação com *E.coli* K88+, o tratamento OE teve menor concentração em relação ao tratamento CP, não diferindo estatisticamente do tratamento CN. No segundo dia de coleta, o

tratamento OE teve menor concentração em relação ao tratamento CN, não diferindo estatisticamente do tratamento CP.

4. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de um *bled* de óleos essenciais em doses terapêuticas e subterapêuticas em substituição ao programa de uso de antibióticos para suínos na fase de creche, crescimento e terminação. Os animais foram desafiados com 3 ml de 10^7 UFC/ml de *Escherichia coli* K88+ nos três primeiros dias de experimento e foram avaliadas resposta de desempenho, parâmetros intestinais e resposta imune.

De acordo com os resultados encontrados, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o desempenho dos leitões no período total de creche. Dados da tabela de Rostagno et al. (2017) mostra que o desempenho esperado para essa fase em peso final, GPD e CRD é de 25,930 kg, 0,655 kg e 1,158 kg, respectivamente. Esse desempenho se mostra superior ao observado, sugerindo que a inoculação bacteriana, somada ao estresse do desmame tiveram um efeito supressor no desempenho dos animais. Além disso, o fornecimento de uma dieta basal mais elaborada para os animais pode ter contribuído para o desempenho equivalente do grupo CN.

Considerando também a fase de crescimento (0 a 87 dias), foi observada uma tendência para maior ganho de peso dos animais que receberam OE comparados aos do CN. Os resultados encontrados por Yan et al. (2010), sugerem que a suplementação de uma mistura de extratos de tomilho, alecrim e orégano melhora o GPD na fase de crescimento.

Também foi observado maior CRD e GPD para os animais do tratamento com OE comparado aos do CN nos dez primeiros dias da terminação e, considerando essa fase total (terminação), um maior CRD comparado ao CN. Janz et al. (2007), ao avaliarem suínos em terminação recebendo dieta suplementada com óleos essenciais observaram que houve apenas uma tendência para maior CRD no tratamento suplementado com óleo essencial de alho.

Embora não tenha sido observada diferença estatística para o peso final considerando todo o período de experimento, numericamente observamos que os animais do tratamento OE estavam quase 5 kg mais pesados quando comparados aos animais do CN (4,736 kg) e CP (4,358 kg) ao final dos 127 dias.

Os antibióticos são frequentemente utilizados nesse período como estratégia para minimizar a ocorrência desse distúrbio intestinal e o seu papel no desenvolvimento da suinocultura é bem documentado (CROMWELL, 2002). Frente as restrições ao uso desses

medicamentos na produção de suínos, aditivos como os óleos essenciais têm sido utilizados como alternativa na prevenção dessa doença (HEO et al., 2013).

Nesse período de sete dias, o antibiótico gentamicina foi utilizado como terapêutico no CP. De acordo com Drummond (2013), de um total de 127 cepas de ETEC isoladas de fezes de suínos, 75,6% apresentaram sensibilidade a esse medicamento.

Os resultados de incidência de diarreia na fase de creche encontrados no presente estudo corroboram com o efeito positivo dos antibióticos em reduzir a diarreia, principalmente na primeira semana dessa fase. Os animais do grupo CP tiveram uma menor incidência de diarreia comparada aos grupos CN e OE.

Além disso, o desafio com a *E.coli* pode ter contribuído para a maior incidência na primeira semana. Estudos mostram que a diarreia pode se agravar 10 horas após a inoculação e permanecer por até sete dias (MARQUARDT et al., 1999; OWUSU-ASIEDU et al., 2003). Nas observações da terceira e quarta semana de creche, os óleos essenciais foram efetivos em reduzir a diarreia nesse grupo comparado aos CP e CN.

Durante o período de fornecimento da dose terapêutica, o resultado de diarreia observado na fase de crescimento mostra uma melhor atuação dos OE em reduzir esse distúrbio comparado ao CN, o que pode ter refletido em um melhor desempenho.

As observações da incidência de diarreia feitas no período de crescimento e, principalmente de terminação embora tenham sido significativas estatisticamente, podem ter sofrido alguma influência do momento de observação. As observações visuais eram dificultadas pela condição visual das baias. As fezes eliminadas muitas das vezes eram diluídas com a água do bebedouro e os animais espalhavam ou deitavam em cima do que era excretado, dificultando a identificação da diarreia.

Os resultados da avaliação microbiológica não mostraram efeito significativo entre os tratamentos. Embora o antibiótico utilizado na primeira semana seja da classe dos aminoglicosídeos, que possuem ação bactericida contra Gram-negativos, não foi observado redução na contagem de *E.coli*. Os antibióticos são utilizados regularmente para a prevenção de doenças e melhoria do desempenho durante o período inicial da vida dos leitões, momento em que são considerados mais vulneráveis aos patógenos. Os efeitos provocados pelos antibióticos na microbiota intestinal podem divergir em diferentes segmentos do intestino, mas os estudos sobre isso são escassos (RETTEDAL et al., 2009; POOLE et al., 2013). A utilização desse medicamento na fase inicial afeta predominantemente a população bacteriana no intestino

delgado (MU et al., 2017), sugerindo que a contagem microbiológica realizada através do conteúdo cecal possa não ter sofrido ação dos antibióticos.

Diferentes estudos têm demonstrado que os óleos essenciais podem perturbar o mecanismo de comunicação entre as bactérias patogênicas e entre os componentes desses óleos, o eugenol e o carvacrol são destacados (ZHOU et al., 2013; BURT et al., 2014; MITH et al., 2015).

O *quorum sensing* (QS) é definido como um mecanismo de comunicação das bactérias que regula a expressão gênica de diferentes processos, como, expressão do fator de virulência, esporulação, formação de biofilme e reprodução (NAZARRO et al., 2013; OMONIJO et al., 2018). As cepas de *E. coli* ETEC usam o QS para responder a sua população de células e coordenar a expressão do gene de virulência importante na interação do microrganismo com o hospedeiro (ZHU et al., 2011).

Por ser um mecanismo dependente da densidade bacteriana para que ocorra a comunicação efetiva, quando o mínimo desta população não é atingido, seu efeito patogênico ou a capacidade de reprodução é comprometido (STURBELLE et al., 2015).

Assim, os óleos essenciais podem ter atuado como inibidores do *quorum sensing*, reduzindo a patogenicidade do microrganismo, assim como o antibiótico possa ter afetado a população microbiana no intestino delgado, sem que houvesse alteração na microbiota do ceco.

Embora tenha sido observada diferenças na incidência de diarreia na primeira semana da fase de creche, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a morfologia intestinal. Isso pode ser explicado pelo tipo de diarreia provocada pela *E. coli* ETEC, que é capaz de alterar o balanço eletrolítico do intestino delgado através da produção de toxinas.

Nos estágios iniciais da infecção por *E. coli* ETEC, não é observado nenhum tipo de alteração histológica evidente, visto que a patogênese envolve mecanismos estritamente bioquímicos pela ação das toxinas. Entretanto, em um segundo momento com a perda de eletrólitos, pode ocorrer atrofia de vilosidades em fases mais tardias (ROSE et al., 1987).

A microbiota intestinal e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) estão intimamente associadas. Dessa maneira, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a produção AGV, visto que a contagem de bactérias não foi alterada em todos os tratamentos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a atividade antioxidante. As enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase, glutathione peroxidase e catalase são importantes para evitar que ocorra um estresse oxidativo no organismo, capaz de

causar danos celulares. Segundo Gonzales & Demple (1995), a cadeia respiratória das células de *E.coli* pode representar até 87% da produção total de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

De acordo com Tkachenko et al. (2012), os antibióticos bactericidas em suas concentrações subletais foram capazes de produzir radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e ânions superóxido em células de *E.coli*, que resultaram em danos às suas proteínas e ao DNA, o que pode provocar menor carga desse patógeno. Os óleos essenciais também são conhecidos pelos seus efeitos antioxidantes como doadores de hidrogênio para os radicais peróxidos (BRENES & ROURA, 2010), promovendo efeitos benéficos aos animais.

Os resultados de IL-10 demonstraram que os animais do grupo OE comparado aos do CN e CP sofreram um menor processo inflamatório, pois a menor concentração dessa citocina indica que houve menor demanda da mesma para controlar a inflamação.

As citocinas anti-inflamatórias são importantes no controle da inflamação causada por patógenos e são liberadas quando há um processo inflamatório acentuado, com o objetivo de atenuar a inflamação e restaurar a homeostase (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI et al., 2012).

A citocina pró-inflamatória TNF- α exerce influência na integridade do intestino, no que se refere à permeabilidade e pode contribuir para distúrbios intestinais. Foi observado que os valores de TNF- α não foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos. Atrelado a isso, foi observado também que a expressão gênica da ocludina teve o mesmo comportamento. Segundo Cui et al. (2007), o aumento da expressão de TNF- α está associado a uma menor expressão da ocludina nas *tight junctions*. Assim, essa correlação foi observada nos resultados encontrados neste trabalho.

Concomitantemente, não foi observada nenhuma mudança na expressão de GLP-2 entre os tratamentos. Yu et al. (2014), sugeriram que o GLP-2 melhora a expressão de proteínas das *tight junctions* como a ocludina no jejuno de leitões desmamados através da via de sinalização MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*). Da mesma forma, a correlação existente entre o GLP-2 e a expressão de proteínas como a ocludina não foi observada.

5. CONCLUSÃO

Esses resultados sugerem que o desempenho observado nas fases de crescimento e terminação foram influenciados pelo uso terapêutico dos óleos essenciais quando comparado aos antibióticos. Embora não tenha sido observadas mudanças significativas na morfologia e barreira intestinal, população microbiana e produção de ácidos graxos voláteis bem como a atividade antioxidante no momento em que amostras foram coletadas, os óleos essenciais se mostraram eficientes em atenuar a resposta inflamatória na fase inicial do período de creche. Assim, o uso de doses terapêuticas e subterapêuticas de óleos essenciais se mostra promissor em substituir os programas de antibióticos para suínos,

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª edição. Rio de, 2012.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 1984. p. 121-126.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Portaria nº 171. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55878469. Acessado em: 02 de janeiro de 2019.
- BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.
- BURT, S. A. et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93414, 2014.
- CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early-weaned piglets. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19, 2013.
- CASEY, D. Nurses' perceptions, understanding and experiences of health promotion. **Journal of Clinical nursing**, v. 16, n. 6, p. 1039-1049, 2007.
- CAO, G. et al. Positive effects of a *Clostridium butyricum*-based compound probiotic on growth performance, immune responses, intestinal morphology, hypothalamic neurotransmitters, and colonic microbiota in weaned piglets. **Food & Function**, 2019.
- CROMWELL, G. L. Why and how antibiotics are used in swine production. **Animal biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 7-27, 2002.
- CUI, W. et al. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 4, p. 330-337, 2010.
- CULLEN, S. P. et al. The effect of dietary garlic and rosemary on grower-finisher pig performance and sensory characteristics of pork. **Irish journal of agricultural and food research**, p. 57-67, 2005.
- DRUMMOND, V. O.; PERECMANIS, S. Genes de enterotoxinas e perfil antimicrobiano de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos no Distrito Federal. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 65, n. 4, p. 1005-1009, 2013.
- FERREIRA, EM., Pires, AV., Susin, I., Biehl, MV., Gentil RS., Parente, MOM., D. M. Polizel, C. V. D. M. Ribeiro, and E. Almeida. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism

in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**.216, 30-39, 2016.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.

GONG, J. et al. Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: Potential and challenges in application. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 94, n. 2, p. 223-241, 2014.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPLÉ, B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13681-13687, 1995.

HEO, J. M. et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013

JANZ, J. A. M. et al. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. **Meat Science**, v. 75, n. 2, p. 350-355, 2007.

LUPPI, A. et al. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. **Porcine Health Management**, v. 2, n. 1, p. 20, 2016.

HUANG, C. et al. Dietary sodium butyrate decreases postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and changing the bacterial communities in weaned piglets. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 12, p. 2774-2780, 2015.

LIU, Y. et al. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p. 1414-1424, 2017.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 1968.

MARQUARDT, R. R. et al. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 283-288, 1999.

MELKEBEEK, V.; GODDEERIS, B. M.; COX, Eric. ETEC vaccination in pigs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 37-42, 2013.

MITH, H. et al. The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157: H7. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 1, p. 1-7, 2015.

MU, C. et al. Differences in microbiota membership along the gastrointestinal tract of piglets and their differential alterations following an early-life antibiotic intervention. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 797, 2017.

- NAGY, B.; FEKETE, Peter Zs. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary research**, v. 30, n. 2-3, p. 259-284, 1999.
- NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013
- OMONJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 126-136, 2018.
- OWUSU-ASIEDU, A.; NYACHOTI, C. M.; MARQUARDT, R. R. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. **Journal of animal science**, v. 81, n. 7, p. 1790-1798, 2003.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- POOLE, T. L. et al. The effect of chlortetracycline on faecal microbial populations in growing swine. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 1, n. 3, p. 171-174, 2013.
- RETTEDAL, E. et al. Alteration of the ileal microbiota of weanling piglets by the growth-promoting antibiotic chlortetracycline. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 17, p. 5489-5495, 2009.
- ROSE, R. et al. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits, and lambs. **Veterinary pathology**, v. 24, n. 1, p. 71-79, 1987.
- ROSTAGNO, H. S. et al., **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4a Ed, 2017.
- SHARMA, P. K.; et al. Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (*Palmarosa*, *Cymbopogon martinii* var. *Motia*) leaf. **Plant Sci.**, v. 203, p.63-73. 2013.
- SAS INSTITUTE. **Sas/Graph 9.2: Graph Template Language User's Guide**. SAS Institute, 2009.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
- SUTHERLAND, M. et al. Effects of transport at weaning on the behavior, physiology and performance of pigs. **Animals**, v. 4, n. 4, p. 657-669, 2014.
- STEIBEL, J. P. et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146-152, 2009.
- STURBELLE, R. T. et al. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. **Veterinary microbiology**, v. 180, n. 3-4, p. 245-252, 2015.
- THACKER, P. A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 35, 2013.

TKACHENKO, A. G. et al. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. **Research in microbiology**, v. 163, n. 2, p. 83-91, 2012.

WANG, D. et al. Effects of keratinase on performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 12, p. 1718-1728, 2011.

YAN, L. et al. Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. **Livestock Science**, v. 128, n. 1-3, p. 115-122, 2010.

YANG, C. et al. Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. **Journal of animal science**, v. 97, n. 1, p. 133-143, 2018.

YU, C. et al. Effect of glucagon-like peptide 2 on tight junction in jejunal epithelium of weaned pigs through MAPK signaling pathway. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 5, p. 733, 2014.

ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2015.

ZHOU, L. et al. Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 4, p. 631-637, 2013.

ZHU, J. et al. Involvement of quorum sensing and heat-stable enterotoxin a in cell damage caused by a porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Infection and immunity**, v. 79, n. 4, p. 1688-1695, 2011.

ZOU, Y. et al. Oregano essential oil induces SOD1 and GSH expression through Nrf2 activation and alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IPEC-J2 cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.