

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

**Avaliação de aditivos alternativos, em substituição aos antibióticos, na
alimentação de leitões recém-desmamados**

Cândida Pollyanna Francisco Azevedo

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

**Piracicaba
2022**

Cândida Pollyanna Francisco Azevedo
Zootecnista

**Avaliação de aditivos alternativos, em substituição aos antibióticos, na alimentação
de leitões recém-desmamados**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **URBANO DOS SANTOS RUIZ**

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

Piracicaba
2022

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

Azevedo, Cândida Pollyanna Francisco

Avaliação de aditivos alternativos, em substituição aos antibióticos, na alimentação de leitões recém-desmamados / Cândida Pollyanna Francisco Azevedo - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 . - - Piracicaba, 2022.

97 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Prébióticos 2. Extrato pirolenhoso 3. Saúde intestinal 4. Sistema imune I.
Título

Dedicatória

À minha amada mãe e saudosa mãe, Maria das Dores Francisco Azevedo, pelo exemplo de força, garra e perseverança. Obrigada pelo amor e pela vida!

Aos meu querido irmão Wilson de Azevedo Júnior, pela lealdade, incentivo e generosidade!

Aos meus avós, Helena Francisca e Archimedes Francisco, pelo amor fraterno e base familiar!

Aos meus queridos e divertidos tios, Maria do Carmo, Ivone, Archimedes, Amélia, Marcos, Olma e Neide pela bondade e incentivo incondicional!

Ao meu amor, Luiz Cláudio, por todo amor e por ser meu amor, incentivo e confiança!

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado uma família abençoada, por ter estado à minha frente me guiando por todas as dificuldades, e por ter colocado em meu caminho anjos de luz.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), pelo privilégio em cursar o Doutorado na instituição que é referência na América Latina.

Ao Professor Dr. Urbano dos Santos Ruiz pela orientação.

À Professora Dra. Carla Maris Machado Bittar pelos conselhos e por toda ajuda necessária para dar continuidade ao Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa concedido ao Prof. Dr. Urbano dos Santos Ruiz (Processo FAPESP 2019/16519-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Doutorado concedida (Processo 1808470).

Aos funcionários do Setor de Suinocultura (ESALQ/USP), Gilberto Antonio Aliberti Júnior “Giba”, José Kossut Knapik “Gaúcho” e Leonilço Ramos “Léo”, por toda ajuda ao longo experimento.

Aos pesquisadores Dr. Eduardo Micotti da Glória e Dr. Carmen M. Sinche Ambrósio, por todo auxílio nas análises microbiológicas.

À minha querida e amada tia, amiga e mãe Amélia Francisco Wegelin, obrigada pelas conversas e companheirismo que tornaram essa caminhada mais leve. Te amo!

Ao meu gigante, Wilson de Azevedo Júnior, obrigada pelo irmão maravilhoso e bondoso que você é!

Ao meu Amor, Luiz Cláudio Costa Silva, por acreditar nos meus sonhos e pelo passado, presente e futuro ao seu lado. Te amo meu sonho bom!

À minha princesa Sophia, prima/irmã que amo!

Ao meu padrinho, Cassimiro Sampaio dos Santos, pelas conversas e sabedoria compartilhada!

Aos meus tios, Toninho, Cassimiro, Cláudio e Adi, por quem tenho grande carinho e admiração!

Às minhas “Dogs” Linda e Dorinha, pelo amor puro!

Aos meus queridos amigos e irmãos da Universidade Federal de Viçosa, Darlene Ana Souza Duarte, Marco Aurélio Schiavo Novaes, Isabela Fernanda, Fernanda Gomes, Eveline B.

Alves, Leury Jesus de Souza, Alysson Hipólito, Jéssica Motta e Renata Veroneze. Amigos são anjos que Deus coloca em nossa vida!

À família Fialho, Wesley Fialho, Aleçandra Pereira Fialho e à Helena Pereira Fialho (minha Ratinha). Obrigada por me acolherem e por serem a minha família em SP.

Aos colegas de Pós-Graduação Leury Jesus de Souza, Thaís Cardoso Vaz, Vinicius R. C. de Paula, Anderson Aparecido Sedano e Natália Cristina Milani pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos meus queridos estagiários, Renata G. Leite, Luísa Ferreira, Iloran Rosário, Hélio Moreira Jr., João Vitor Fiorio por todo auxílio e e por tornarem a rotina mais leve e divertida!

À família AgriNews Brasil, Priscila Beck, Victoria Domingues, Daniela Musto, Márcia Cândido e Karla Bordin. Obrigada por tornarem a rotina de trabalho tão especial. Amo vocês!!!

À todos que de alguma forma se fizeram presentes nesta jornada, meus sinceros agradecimentos!

Biografia

Cândida Pollyanna Francisco Azevedo, filha de Wilson de Azevedo e Maria das Dores Francisco Azevedo, nascida em 22 de fevereiro de 1988, natural de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Ingressou na graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Minas Gerais em março de 2008, concluindo a graduação em 31 de julho de 2013.

Em agosto de 2013 iniciou o Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, tendo como área de concentração Bioclimatologia Animal e Nutrição de Monogástricos, submetendo à defesa da dissertação em 21 de agosto de 2015.

Em fevereiro de 2018 iniciou o Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Escola Superior “Luiz de Queiroz” – ESALQ-USP.

*a gratidão
pelo que vem
seja bom ou
ruim
nos ensina
que tudo
faz parte da
nossa história*

*e se não fosse
aquele dia
que tudo foi
mal
você não seria
quem é hoje*

*e isso seria
uma pena.*

Autor desconhecido.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
Referências	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Estresse do desmame	17
2.2. Uso prudente de antibióticos como promotores de crescimento	20
2.3. Prebióticos	21
2.4. Extrato Pirolenhoso	25
Referências	27
3. USO DE BETA 1,3-1,6 GLUCANOS E MANANOLIGOSSACARÍDEO SOLÚVEL NA DIETA DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, MORFOLOGIA INTESTINAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	37
3.1. Introdução.....	39
3.2. Material e métodos	41
3.2.1. Animais, instalações e dietas experimentais	41
3.2.2. Procedimentos experimentais	43
3.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	44
3.3. Resultados	45
3.4. Discussão.....	51
Referências	54
4. UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PIROLENHOSO EM SUBSTITUIÇÃO AO USO DE ANTIBIÓTICOS E SEUS EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES PÓS-DESMAME.....	59
4.1. Introdução.....	61
4.1. Material e métodos	65
4.1.1. Dietas experimentais	65
4.1.2. Desafio sanitário	65
4.1.3. Desempenho zootécnico e incidência de diarreia	69
4.1.4. Parâmetros sanguíneos	69
4.1.5. Eutanásia de leitões	70
4.1.6. Peso de órgãos e mensuração do pH	70
4.1.7. Histologia do epitélio intestinal	70
4.1.8. Digestibilidade de nutrientes das dietas	71

4.1.9.	Avaliação de populações microbianas no conteúdo cecal.....	71
4.1.10.	Avaliação in vitro da atividade antibacteriana do extrato pirolenhoso	73
4.1.11.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	74
4.1.12.	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	75
4.1.13.	Delineamento experimental e análises estatísticas	75
4.2.	Resultados.....	75
4.2.1.	Desempenho e incidência de diarreia	75
4.2.2.	Parâmetro sanguíneos	77
4.2.3.	Peso dos órgãos e pH estômago e ceco	78
4.2.4.	Histologia do epitélio intestinal.....	79
4.2.5.	Digestibilidade de nutrientes das dietas	80
4.2.6.	Avaliação de populações microbianas no conteúdo cecal.....	80
4.2.7.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	81
4.3.	Discussão	83
4.4.	Conclusão.....	89
	Referências.....	89
5.	CONCLUSÃO GERAL	97

RESUMO

Avaliação de aditivos alternativos, em substituição aos antibióticos, na alimentação de leitões recém-desmamados

O presente estudo foi dividido em dois experimentos, utilizando-se leitões recém-desmamados, dos 21 aos 63 dias de idade, para avaliação de aditivos alternativos a antibióticos promotores de crescimento (APC). No experimento 1 os animais foram alimentados com uma dieta basal (DB) sem qualquer aditivo zootécnico, ou com dietas similares à DB, porém suplementadas com β -glucanos em 50 e 100 ppm (BG50 e BG100), mananoligossacarídeos (MOS) e halquinol, com 10 repetições e 5 animais por unidade experimental (UE). Os parâmetros avaliados foram ganho de peso diário de (GPD), consumo diário de ração (CDR), conversão alimentar (CA), incidência de diarreia, morfologia intestinal, marcadores da resposta imune (Imunoglobulinas A, G e M), eritrograma e hemograma completo. Fezes de suínos adultos diluídas em água (1:5) foram aspergidas sobre as baias antes do alojamento, a fim de promover desafio sanitário. No experimento 2 os suínos receberam uma DB sem qualquer aditivo zootécnico, DB com halquinol ou extrato pirolenhoso (EP) em 1 (EP1), 2 (EP2) e 3% (EP3), totalizando 5 tratamentos, 10 repetições e 4 animais por unidade experimental. Foram avaliadas o GDP, CDR, CA, incidência de diarreia, pesos (relativo e absoluto) dos órgãos, morfologia intestinal, pH dos conteúdos do estômago e ceco, marcadores da resposta imune (Interleucinas (IL) IL-6, IL-10 e TNF- α), parâmetros sanguíneos e composição microbiana do conteúdo do ceco dos leitões. Cada animal foi inoculado com 1 mL com cepa de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), para promover desafio sanitário. Além disso, foi realizado o teste *in vitro* para determinar concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima. Em ambos os experimentos, adotou-se delineamento experimental em blocos casualizados e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). No experimento 1, não foram observados efeitos dos tratamentos sobre o desempenho e a incidência de diarreia. Contudo, os animais alimentados com BG100 apresentaram tendência ($P = 0,0624$) para maior GDP em relação aos leitões submetidos a DB (264.1 vs. 213.4g/dia), de 8 a 14 dias do experimento. Não houve efeito da suplementação de prebióticos sobre a morfologia intestinal e os parâmetros hematológicos. Entretanto, os leitões alimentados com BG50 apresentaram concentração de neutrófilos 20% maior ($P < 0,05$) em comparação aos animais que receberam a DB no dia 21 e, além disso, a inclusão de MOS nas dietas aumentou ($P < 0,05$) a concentração de linfócitos em 14% no soro sanguíneo dos animais do grupo controle, em comparação ao grupo BG50. A concentração de IgA no soro sanguíneo dos animais DB foi duas vezes maior ($P < 0,05$) em comparação ao grupo alimentado com BG100 no dia 7. No experimento 2, não foram observados efeitos dos tratamentos sobre o desempenho, pesos (relativo e absoluto) dos órgãos, incidência de diarreia, morfologia intestinal, pH do estômago e ceco e parâmetros sanguíneos. A inclusão de EP e antibiótico contribuíram para a concentração de IL-10, aumentando, assim, a imunomodulação e redução da resposta inflamatória. A concentração de *Lactobacillus* no conteúdo do ceco foi maior ($P < 0,05$) nos animais que receberam EP3. Além disso, observou-se reduções numéricas de 90,5%, 64,3%, 62,1% e 34,6% nos gêneros *Escherichia coli*, *Clostridium* 1, *Streptococcus* e *Campylobacter*, respectivamente, em razão da utilização do EP. Os testes *in vitro* demonstraram o efeito bacteriostático e bactericida do EP a 6%. Mais estudos são necessários para elucidar os níveis dos prebióticos e EP na ração e seus efeitos sobre o desempenho, sistema imune e saúde intestinal em leitões pós-desmame.

Palavras-chave: Prebióticos, Extrato pirolenhoso, Saúde intestinal, Sistema imune

ABSTRACT

Evaluation of alternative additives, to replace antibiotics, in the feed of weanling piglets

The present study was divided into two experiments, using newly weaned piglets, from 21 to 63 days of age, to evaluate alternative additives to growth-promoting antibiotics (GPA). In experiment 1, the animals were fed a basal diet (BD) without any growth promoter additive, or diets similar to BD, but supplemented with β -glucans at 50 and 100 ppm (BG50 and BG100), mannanoligosaccharides (MOS) and halquinol, with 10 replicates and 5 animals per experimental unit (EU). The parameters evaluated average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), feed conversion (FC), incidence of diarrhea, intestinal morphology, immune response markers (Immunoglobulins A, G and M) and blood parameters. Adult swine feces diluted in water (1:5) were sprinkled over the pens before housing, in order to promote a sanitary challenge. In experiment 2 the pigs received a BD without any growth promoter additive, BD with halquinol or pyroligneous extract (PE) in 1 (PE1), 2 (PE2) and 3% (PE3), totaling 5 treatments, 10 repetitions and 4 animals per unit experimental. The parameters evaluated were the ADG, ADFI, FC, diarrhea incidence, organ weights (relative and absolute), intestinal morphology, stomach and cecum contents pH, immune response markers (Interleukins (IL) IL-6, IL-10 and TNF- α), blood parameters and microbial composition in the cecum content of the piglets. Each animal was inoculated with 1 mL of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain (ETEC): *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), to promote sanitary challenge. In addition, the in vitro test was performed to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration. In both experiments, a randomized block design was adopted and data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey's test ($P < 0.05$). In experiment 1, no effects of treatments on growth performance and incidence of diarrhea were observed. However, animals fed BG100 tended ($P = 0.0624$) to have higher ADG compared to piglets fed BD (264.1 vs. 213.4g/day), from 8 to 14 days of the experiment. There was no effect of prebiotics supplementation on intestinal morphology and hematological parameters. However, piglets fed with BG50 had 20% higher neutrophil concentration ($P < 0.05$) compared to animals that received BD on day 21 and, in addition, the inclusion of MOS in the diets increased ($P < 0.05$) the concentration of lymphocytes in 14% in the blood serum of animals compared to the BG50 group. The IgA concentration in the blood serum of BD animals was twice as high ($P < 0.05$) compared to the group fed BG100 on day 7. In experiment 2, no treatment effects were observed on growth performance, organ weights (relative and absolute), incidence of diarrhea, intestinal morphology, stomach and cecum pH and blood parameters. The inclusion of PE and antibiotics contributed to the concentration of IL-10, thus increasing immunosuppression. The concentration of *Lactobacillus* was higher ($P < 0.05$) in cecum content of animals that received EP3. Furthermore, numerical reductions of 90.5%, 64.3%, 62.1% and 34.6% were observed in the genera *Escherichia coli*, *Clostridium* 1, *Streptococcus* and *Campylobacter*, respectively, due to the use of PE. In vitro tests demonstrated the bacteriostatic and bactericidal effect of 6% PE. More studies are needed to elucidate the levels of prebiotics and PE in the feed and their effects on performance, immune system and intestinal health in post-weaning piglets.

Keywords: Prebiotics, Pyroligneous extract, Intestinal health, Immune system

1. INTRODUÇÃO

O desmame precoce é uma das práticas mais desafiadoras no ciclo de vida do suíno de criação comercial. Os leitões recém-desmamados são geralmente expostos a uma série de agentes estressores, nutricionais, psicológicos, ambientais, fisiológicos e sociais (Laine et al., 2008; Heo et al., 2015), que provocam redução do desempenho e prevalência da diarreia pós-desmame (Campbell et al., 2013). Ao serem submetidos à transição de dieta, do leite materno para uma dieta de desmame, os leitões sofrem uma redução severa no consumo de ração por alguns dias após o desmame (Kluess et al., 2010). Além disso, para se adaptar ao novo ambiente, a composição da microbiota gastrointestinal também é alterada em decorrência de mudanças no comportamento alimentar e composição da dieta. Esse período é frequentemente associado a um desafio devido à alta incidência de distúrbios gastrointestinais, como a diarreia nutricional pós-desmame (Aherne et al., 1992; Kluess et al., 2010).

A diarreia pós-desmame é considerada um grande problema de saúde e causa substancial morbidade e mortalidade em suínos. Vale ressaltar que, a diarreia pós-desmame é uma doença gastrointestinal multifatorial com fatores etiológicos importantes (Lallès et al., 2007; Atasever et al., 2018). O trato gastrointestinal é um ecossistema complexo e equilibrado. A composição da dieta é um fator importante que influencia o ecossistema microbiano intestinal (Leser et al., 2002; Jayaraman & Nyachoti, 2017). Sendo assim, ao considerar o equilíbrio entre o ecossistema microbiano intestinal e a composição da dieta, a diarreia nutricional pós-desmame é um grande problema no processo de desmame (Pluske et al., 2002).

A estratégia mais eficiente para aliviar a diarreia nutricional pós-desmame é a regulação da composição nutricional da dieta. Várias abordagens nutricionais para atenuar o impacto a transição do desmame e aliviar doenças entéricas foram pesquisadas nos últimos anos (Thacker, 2013; Ferreira et al., 2017). Dentre as potenciais alternativas se destacam os probióticos, prebióticos, enzimas, acidificantes, extratos de plantas e nutracêuticos, como cobre (Li et al., 2012; Wang et al., 2012; Zuo et al., 2015; Long et al., 2018; Lu et al., 2018; San Andres et al., 2019).

Os prebióticos são caracterizados como substratos seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota do trato gastrointestinal (TGI), conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (Gibson et al., 2010). A maioria dos prebióticos identificados são carboidratos com diferentes estruturas moleculares que ocorrem naturalmente na alimentação humana e animal. Carboidratos dietéticos, como fibras, são prebióticos candidatos, mas os mais promissores são os oligossacarídeos não digestíveis (ONDs) (Gaggia et al., 2010). Dentre os ONDs estudados na nutrição animal

destacam-se: β -glucanos, frutoligossacarídeos (FOS), galactoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS) (Gaggia et al., 2010).

O β -glucano caracteriza-se como um tipo de polissacarídeo funcional constituinte da parede celular de fungos, bactérias e cereais (aveia, centeio e cevada, etc). Possui várias funções biológicas, dentre elas, modulação do sistema imune e regulação da glicose. A molécula de β -glucano geralmente é composta por resíduos de glucopiranosil ligados em β -1,3 com um pequeno número de cadeias laterais de resíduos de glucopiranosil ligados em β -1,6. As ligações glicosídicas especiais e as ligações de hidrogênio intermoleculares contribuem para um tipo de estrutura molecular helicoidal única que é facilmente reconhecida pelas células do sistema imunológico (Xiong et al., 2015).

Os mananoligossacarídeos (MOS) são carboidratos não digestíveis compostos por blocos de manose e podem ser encontrados na parede celular de levedura em formação complexa. *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada nas indústrias de panificação e cervejaria e a partir destes processos obtêm-se exclusivamente os MOS que são utilizados na nutrição animal. A parede celular de *S. cerevisiae* contém manana-proteínas e glucanas, os principais constituintes da parede celular externa são polímeros de manana com ligações α (1-6) e α (1-2) ou, em menor extensão α (1-3) de cadeias laterais limitadas (Halas e Nochta, 2012).

Outra recente estratégia utilizada para aliviar a diarreia nutricional pós-desmame é o extrato pirolenhoso (EP). O extrato pirolenhoso (EP) é um coproduto obtido após a produção do carvão vegetal, a partir da condensação da fumaça formada pela carbonização da biomassa da madeira (Araújo et al., 2017).

O EP também conhecido como vinagre de madeira, ácido pirolenhoso e mokusaku, possui diversas formas de aplicação, dentre elas a agrícola, é composto por água em sua maior parte (80 a 90% v/v) e uma mistura complexa de milhares de compostos, contendo nesses mais de 200 compostos orgânicos decorrentes da degradação térmica da madeira, como ácido acético, álcoois, acetonas, ésteres, fenóis e furanos (Araújo et al., 2017).

Diante do exposto, a presente tese, dividida em dois experimentos, avaliou, no primeiro experimento a inclusão de β -glucano, MOS e, no segundo experimento, avaliou, a inclusão de EP em dietas para leitões pós-desmame como estratégia para atenuar os impactos da diarreia nutricional pós-desmame.

Referências

- Aherne, F.H.M., Kornegay, E.T., G. C. Shurson, G.C., et al., 1992. Management and Nutrition of the Newly Weaned Pig, National Pork Producers Council, Des Moines, IA, USA.
- Araújo, E.S., Pimenta, A.S., Feijó, F.M.C., Castro, R.V.O., Fasciotti, M., Monteiro, T.V.C., Lima, K.M.G., 2017. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. *J. Appl. Microbiol.* 124, 85 - 96, 2017.
- Atasever, A.G., Ozcan, P.E., Kasali, K., Abdullah, T., Orhun, G., E. Senturk, E., 2018. The frequency, risk factors, and complications of gastrointestinal dysfunction during enteral nutrition in critically ill patients. *Terap. Cli. Risk Manag.* 14,385–391.
- Campbell, J. M., Crenshaw, J.D., Polo, J., 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 19.
- Ferreira, S.V.; Barbosa, L.M.R.; Soares, M. H.; Marcolla, C.S.; Holanda, D.M.; Saraiva, A., 2017. Alternatives to antibiotics in diets of weaned piglets. *Cienc. Rural*, 47, 12.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 15-28.
- Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington R., 2010. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bullet.* 7, 1 – 19.
- Halas, V., Nochtá, I., 2012. Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals.* 23, 261–274.
- Heo, J.M., Kim, J.C., Yoo, J., Pluske, J.R., 2015. A between experimente analysis of relationships linking dietary protein intake and post-weaning diarrhea in weanling pigs under conditions of experimental infection with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Anim. Sci. J.* 86, 286–293.
- Jayaraman, B., Nyachoti, C.M., 2017. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Anim. Nutr.* 3, 205-211.
- Kluess, J., Schoenhusen, U., Souffrant, W.B., Jones, P.H., Miller, B.G., 2010. Impact of diet composition on ileal digestibility and small intestinal morphology in early-weaned pigs fitted with a T-cannula. *Animal.* 4, 586–594.
- Laine, T.M., Lyytikäinen, T., Yliaho, M., Anttila, M., 2008. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Vet. Scan.* 50, 21.

- Lallès, J.P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 260–268.
- Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M., Moller, M., 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited,” *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 673–690.
- Li, P., Piao, X., Ru, Y., Han, X., Xue, L., Zhang, H., 2012. Effects of Adding Essential Oil to the Diet of Weaned Pigs on Performance, Nutrient Utilization, Immune Response and Intestinal Health. *Asian-Aust J Anim Sci* 25, 1617-1626.
- Long, S.F., Xua, Y.T., Pana, L., Wanga, Q.Q., Wanga, C.L., Wua, J.Y., Wub, Y.Y., Hanb, Y.M., Yunc, C.H., Piaoa, X.S., 2018. Mixed organic acids as antibiotic substitutes improve performance, serum immunity, intestinal morphology and microbiota for weaned piglets. *Anim Feed Sci and Tech.* 235, 23–32.
- Lu, X., Zhang, M., Zhao, L., Ge, K., Wang, Z., Jun, L., Ren, F., 2018. Growth performance and post-weaning diarrhea in piglets fed a diet supplemented with probiotic complexes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1791–1799.
- San Andres, J.V., Mastromano, G.A., Li, Y., Tran, H., Bundy, J.W., Miller, P.S., Burkey, T.E., 2019. The effects of prebiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs. *Transl Anim Sci.* 3, 1315–1325.
- Thacker, P.A., 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 4, 35
- Yin, J., Wu, M.M., H. Xiao, H., Ren, W.K., Duan, J.L., Yang, G., Li, T.J., Yin, Y.L., Development of an antioxidante system after early weaning in piglets, *J. Anim Sci.* 92, 612–619.
- Wang, M.Q., Du, YJ., Wang, C., Tao, W.J., He, Y.D., Li, H., 2012. Effects of Copper-Loaded Chitosan Nanoparticles on Intestinal Microflora and Morphology in Weaned Piglets. *Biol. Trace Elem. Res.* 149, 184-189.
- Zuo, J., Ling, B., Long, L., Li, T., Lahaye, L., Yang, C., Feng, D., 2015. Effect of dietary supplementation with protease on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. *Anim Nutr* 4, 276-282.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estresse do desmame

O desmame em condições comerciais é um dos eventos mais estressantes ao qual os leitões são submetidos. Neste momento, o leitão recém-desmamado é exposto a agentes estressores psicossociais e físicos, incluindo separação materna, mudanças abruptas na dieta e ambientais, e mistura e estabelecimento de hierarquia social com leitões de diferentes leitegadas (Forbes, 1995; Whittemore & Green, 2006).

Essas mudanças sociais contribuem consideravelmente para o estresse, que, por sua vez, pode desencadear o mau funcionamento do trato gastrointestinal (TGI). Várias respostas hormonais ocorrem durante uma resposta ao estresse por meio da ativação nervosa simpática da medula adrenal e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). As catecolaminas (adrenalina / noradrenalina e dopamina) são liberadas da medula adrenal quando expostas a fatores de estresse (Squires, 2010). Esses hormônios podem aumentar a frequência cardíaca, a constrição dos vasos sanguíneos no TGI e o metabolismo, criando a "resposta de luta ou fuga". O eixo HHA libera o hormônio liberador de corticotrofina durante eventos estressantes, que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticóides como o cortisol (Squires, 2010).

Além disso, essas mudanças geralmente levam a uma redução no consumo de ração (Pluske et al., 2019). Estima-se que no final da primeira semana pós-desmame, a ingestão de energia metabolizável (EM) é 60 a 70% inferior àquela do período pré-desmame, e que leva aproximadamente duas semanas após o desmame para recuperar a ingestão de EM (Campbell et al., 2013). A redução do consumo de ração pode causar inflamação intestinal por meio da ativação do eixo cérebro-intestino (Mereu et al. 2015). Esse estresse psicossocial pode levar a uma rápida degeneração da estrutura intestinal, causando atrofia das vilosidades induzida por estresse e maior exposição a infecção secundária, devido ao comprometimento da função de barreira intestinal (Moeser et al. 2017; Gimsa et al. 2018). Essas mudanças podem persistir na idade adulta e são mais significativas no desmame precoce (< 23 dias de idade), em comparação a suínos desmamados tardiamente.

Durante o período de desmame a imaturidade do sistema imunológico e da microbiota intestinal tornam os leitões suscetíveis a patógenos que levam à diarreia pós-desmame (Gresse et al., 2017). A diarreia pós-desmame tem sido a principal e crescente causa de mortalidade na indústria suinícola durante a fase de creche.

Durante o desmame ocorre ativação nas respostas imunológicas, tais como a síntese de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias influenciam a integridade intestinal,

bem como a função epitelial no que se refere à permeabilidade e transporte de nutrientes (McKay & Baird, 1999). Pie et al. (2004) avaliaram a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α em leitões com 28 dias de idade ao longo de oito dias após o desmame. Os autores demonstraram que o desmame está associado a uma regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias e relataram aumento da expressão de TNF- α no intestino proximal e médio seguido por aumentos no intestino delgado distal e cólon proximal. Os autores concluíram que o desmame está associado a uma regulação positiva precoce de genes de citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir para distúrbios funcionais resultando na redução do desempenho e exercem um papel fundamental na diarreia pós-desmame.

Além disso, a regulação do metabolismo também pode ser alterada em resposta ao desmame quando ocorre inflamação associada ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias regulam a função imunológica e o crescimento ou processos metabólicos (Johnson, 1997; Spulock, 1997). Assim, o estresse do desmame impacta tanto as alterações estruturais quanto as respostas imunológicas ativas.

A composição da microbiota intestinal e a sucessão ecológica no início da vida são moduladas por uma série de fatores internos e externos. Por exemplo, ambiente, dieta fornecida à matriz, mudança na dieta, administração de probióticos e prebióticos e suplementação de antibióticos na ração desempenham papéis importantes na formação da comunidade microbiana intestinal de leitões (Pajalliro et al., 2014; Bian et al., 2016; Chae et al., 2016). Assim, o desmame nas primeiras quatro semanas de vida é um momento importante de transição e estresse para os animais e a compreensão da dinâmica da microbiota intestinal durante a transição do desmame é de interesse, pois influencia a saúde geral e o desempenho dos suínos.

A microbiota intestinal de leitões jovens sofre uma sucessão ecológica muito rápida após a indução de vários fatores durante o desmame. Um dos principais fatores que influenciam as mudanças na microbiota em leitões durante o desmame é a mudança abrupta na dieta de fontes de nutrientes simples para mais complexas, o que pode afetar a capacidade de absorção do intestino delgado e provavelmente influencia o crescimento e a eficiência alimentar (Guevarra et al., 2019).

Além disso, o estabelecimento de uma microbiota benéfica é importante durante a fase de desmame pois os leitões ainda possuem um sistema imunológico imaturo e são dependentes do leite materno para prevenir a colonização e crescimento excessivo de patógenos oportunistas (Castillo et al., 2007). Sendo assim, é necessário compreender melhor a sucessão microbiana do intestino durante a transição do desmame, e como diversos fatores influenciam as alterações

microbianas do intestino dos leitões em associação com a melhoria da saúde gastrointestinal, desempenho do crescimento e bem-estar dos leitões (Gresse et al., 2017).

A microbiota intestinal protege o organismo contra patógenos, regulando a resposta imune do hospedeiro. Uma recente análise metagenômica da microbiota fecal em leitões diarreicos revelou que a diarreia foi associada ao aumento na abundância relativa de *Prevotella*, *Sutterella*, *Campylobacter* e *Fusobacteriaceae* (Yang et al., 2017). Dou et al. (2017) avaliaram o potencial da composição da microbiota intestinal precoce de leitões, como um indicador de suscetibilidade à diarreia pós-desmame, de leitões desmamados em más condições de alojamento. Os autores observaram que quando comparada a leitões diarreicos, a microbiota intestinal de leitões saudáveis apresentou maior abundância de Prevotellaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae e Lactobacillaceae. Os resultados desses estudos sugerem que a composição microbiana intestinal pode ser usada como um biomarcador para prever o estado de saúde dos leitões.

Durante a transição do desmame, os leitões experimentam uma queda imediata, mas transitória, no consumo de alimento, o que contribui para a inflamação intestinal (McCracken et al., 1999; Lalles et al., 2004). Em um estudo recente, foram propostos os mecanismos pelos quais a inflamação intestinal contribui para o desequilíbrio da microbiota (Zeng et al., 2017). Em condições de inflamação intestinal, a resposta do hospedeiro resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, como óxido nítrico (NO), que é rapidamente convertido em nitrato (NO₃⁻) quando liberado no lúmen intestinal (Gresse et al., 2017; Zeng et al., 2017; Pluske et al., 2018). Esse ambiente rico em nitrato confere vantagens para o crescimento de algumas cepas de *E. coli*, que possuem genes de nitrato redutase ausentes em espécies de Clostridia ou Bacteroidia (Gresse et al., 2017).

Vale ressaltar que, alguns patógenos dentro da família Enterobacteriaceae, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), induzem ao processo de inflamação intestinal em suínos, causando a disbiose (Drumo et al., 2015; Pollock et al., 2018). Por exemplo, em um modelo de leitão de infecção por *Salmonella Typhimurium*, Arguello et al. (2018) observaram que houve uma redução na população de bactérias desejáveis, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, com um aumento em bactérias patogênicas, *Citrobacter* e uma depleção em bactérias anaeróbias, nomeadamente *Clostridium*, *Ruminococcus* ou *Diallister* na mucosa do íleo de leitões desmamados. Portanto, a inflamação intestinal associada ao desmame inicia distúrbios na microbiota intestinal, o que favorece o crescimento de bactérias enteropatogênicas, especialmente Enterobacteriaceae.

2.2. Uso prudente de antibióticos como promotores de crescimento (APC)

Os antibióticos são amplamente utilizados como promotores de crescimento na alimentação animal há mais de 50 anos. Eles representam uma ferramenta extremamente importante na produção eficiente de carne suína, bovina, de aves e outros produtos de origem animal. Quando usados em níveis baixos (subterapêuticos) nas rações, os antibióticos são capazes de promover melhorias nas taxas de crescimento e eficiência da utilização da ração, reduzem a mortalidade e morbidade e melhoram o desempenho reprodutivo (Cromwell et al., 2002).

Da produção total de antibióticos para tratamento humano e para produção animal, aproximadamente 25% é usado em animais de produção e 90% dessa porção foi relatada como sendo usada em concentrações subterapêuticas como promotores de crescimento (APHIS, 1996; Ângulo et al., 1998). O uso de antimicrobianos em diferentes dosagens associado à exposição dos animais aos mesmos tem sido exacerbado, sendo em 66,3% da vida dos animais, em média, nas diferentes fases de produção (72% das maternidades e 96% creches e terminações) (Dutra, 2017).

Embora o uso de antibióticos seja importante para a manutenção da saúde e bem-estar animal dentro dos sistemas de produção, o uso em larga escala principalmente em doses subterapêuticas levantou preocupações a respeito da seleção de bactérias multirresistentes a várias classes de antibióticos (Morés, 2014; WHO, 2018). Essas preocupações se desenvolveram em torno das seguintes questões: (1) o uso subterapêutico de antimicrobianos em rações para animais cria bactérias resistentes a antimicrobianos; (2) se o uso subterapêutico fosse eliminado, o nível de resistência das bactérias abrigadas pelos animais seria reduzido; e (3) reduzir a resistência aos antibióticos em medicamentos melhoraria a saúde humana porque o potencial de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos de animais para humanos seria reduzido (National Research Council, 1998).

Além disso, a descoberta de genes bacterianos resistentes a antibióticos que são utilizados na saúde humana, como por exemplo, o gene de resistência a colistina mediado por plasmídeo (*mcr-1*) que foi encontrado em *Escherichia coli* de suínos e em humanos na China (LIU et al., 2016), reforçou o debate sobre a possível transmissão horizontal de resistência microbiana e a necessidade de ações para uso de forma racional desses agentes.

A média global de uso de antimicrobianos varia em torno de 172 mg/kg de suíno produzido (Van Boeckel et al., 2015). Ao passo que, no Brasil, a média de uso de antimicrobianos é de 358,0 mg/kg de suíno produzido. A elevada inclusão de APC foi associada à utilização em média de pelo menos sete princípios ativos, sendo eles: Amoxicilina, Colistina,

Doxiciclina, Enramicina, Florfenicol, Tiamulina e Tilosina e a exposição por longos períodos. Evidenciando, assim, o uso excessivo de antibióticos nos sistemas de produção nacional em comparação à média global (Dutra, 2017).

Dessa forma, iniciativas globais começaram a surgir na tentativa de minimizar o agravamento da resistência antimicrobiana. Em 2006, o uso de APC em dietas de suínos foi banido pela União Europeia (Gaggia; Mattarelli; Biavati, 2010), e vários outros países também já implementaram ou vem implementando políticas de restrição nos próximos anos (Maron; Smith; Nachman, 2013). No Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento também restringiu nos últimos anos diversos antimicrobianos com finalidades de promotores de crescimento (Dutra, 2017) e recentemente implementou o Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos para avaliar os riscos, tendências e padrões na ocorrência de disseminação de resistência por meio de alimentos de origem animal (MAPA, 2021).

Devido ao fato de que o uso de antibióticos foi proibido e que a expansão desta política para outros países agora pode ser esperada, intensas pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de estratégias alternativas com o objetivo de manutenção da saúde e desempenho animal (Chen et al., 2005; Bomba et al., 2006; Castillo et al., 2008). Várias substâncias naturais, muitas das quais estão disponíveis comercialmente, foram investigadas como alternativas eficientes aos antibióticos como promotores de crescimento. Atualmente, probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas, fitobióticos, adsorventes de argila e outros estão sob investigação. Esses aditivos podem exercer efeitos benéficos na composição da microbiota e, conseqüentemente, afetar a saúde animal e o desempenho (Vondruskova et al., 2010).

2.3.Prebióticos

A modulação da microbiota intestinal a partir da utilização de aditivos zootécnicos, tais como pré e probióticos tornou-se uma das alternativas na nutrição animal a fim de atender a legislação que proíbe o uso de antibióticos, em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento na produção animal (Anadón et al., 2019).

De acordo com a definição atual, os prebióticos são caracterizados como ingredientes seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota do trato gastrointestinal (TGI), conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (Gibson et al., 2010).

Embora o conceito de prebiótico tenha sido elucidado ao longo dos anos, para ser considerado um prebiótico eficiente, propõe-se que o prebiótico atenda aos seguintes critérios, os quais devem ser comprovados por estudos *in vitro* e *in vivo*: não digestível (resistência à acidez estomacal, digestão enzimática e absorção intestinal na parte superior do TGI); boa fermentação pela microbiota do intestino grosso; e estimulação seletiva do crescimento e atividade de bactérias intestinais (Macfarlane & Cummings, 1999; De Vrese & Schrezenmeir, 2008).

Os prebióticos incluem uma pluralidade de polissacarídeos não-amiláceos (PNAs) ou oligossacarídeos, incluindo mananoligossacarídeos (MOS), frutanos (FOS e inulina), oligofrutose, galactanos (galacto-oligossacarídeos (GOS)), malto-oligossacarídeos, lactulose, lactitol, glucoligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, soja-oligossacarídeo, isomalto-oligossacarídeo (IOS) e pirodextrinas (Gibson et al., 2017).

Os prebióticos possuem vários efeitos benéficos em animais e humanos a partir dos seguintes mecanismos de ação: i) estimula seletivamente microrganismos benéficos da microbiota intestinal com atividade imunomoduladora (como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*); ii) inibe a adesão epitelial e invasão de microrganismos patogênicos; iii) aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), vitaminas, bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos. Butirato, propionato, acetato e piruvato são capazes de alterar benéficamente a expressão de citocinas e melhorar a imunidade; iv) melhora a integridade intestinal; v) aumenta a produção de muco; vi) aumento de citocinas anti-inflamatórias; vii) diminuição de citocinas pró-inflamatórias; viii) efeitos benéficos no tecido linfático associado ao intestino ou GALT (do inglês, *gut-associated lymphoid tissue*) e no sistema imunológico da mucosa; ix) aumentando a IgA da mucosa, alterando a expressão de citocinas e linfócitos, aumentando a IgA secretora; x) melhorando o desenvolvimento do intestino delgado; xi) aumento da altura das vilosidades, profundidade da cripta e número de células caliciformes por vilosidade.

O β -glucano é um tipo de polissacarídeo funcional constituinte da parede celular de fungos, bactérias e cereais (aveia, centeio e cevada, etc). Possui várias funções biológicas, ativação da função imunológica, anti-inflamatório e regulação da glicose. A molécula de β -glucano geralmente compreende resíduos de glucopiranosil ligados em β -1,3 com um pequeno número de cadeias laterais de resíduos de glucopiranosil ligados em β -1,6. As ligações glicosídicas especiais e as ligações de hidrogênio intermoleculares contribuem para um tipo de estrutura molecular helicoidal única que é facilmente reconhecida pelas células do sistema imunológico (Xiong et al., 2015).

Estudos indicam que o β -glucano pode promover melhorias no desempenho de ratos (Belobrajdic et al., 2015), frangos de corte (Tian et al., 2016), peixes (Jiang et al., 2016), suínos (Lee et al., 2017) e bovinos (Ma et al., 2015), devido aos seus efeitos imunomodulatórios, antitumorais, antimutagênicos, anti-inflamatórios, entre outros (Robertsen, 1999; Kogan e Kocher, 2007; Magnani, 2008).

Os β -glucanos originalmente usados como imunomoduladores de amplo espectro também podem melhorar a saúde do TGI, aumentando as funções de barreira da mucosa e contribuindo para o aumento do desempenho animal. No TGI, os nutrientes são digeridos e, através da mucosa intestinal, absorvidos pelo corpo. Os glucanos podem ter uma influência substancial na composição da microbiota intestinal, o que não apenas ajuda a digestão, mas direta e indiretamente pode apoiar as atividades imunológicas do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que representa o maior órgão imunológico em mamíferos (Vetvicka et al., 2014).

Para avaliar os efeitos dos glucanos sobre os parâmetros imunológicos em suínos com ascariose experimental (animais infectados via oral com ovos infectantes de *Ascaris suum* na dose de 20.000 ovos por leitão), Benková et al. (1992) combinaram glucanos com imunoglobulina suína e zinco e, observaram elevação significativa dos níveis de células T e B do sangue periférico e estímulo da atividade fagocítica das células da série branca do sangue. Além disso, os autores constataram que esta combinação ofereceu 65% de efeitos protetores contra a ascariose. Esses efeitos foram observados já nos primeiros dias de infecção. A produção dos diversos tipos de imunoglobulinas pode ser afetada pelos glucanos, com doses menores favorecendo a IgA (Sauerwein et al., 2007).

Em estudo conduzido por Li et al. (2006) foi demonstrado que dietas suplementadas com glucanos regulam parcialmente a síntese de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 modulando o sistema imune, mas também regulando o metabolismo de nutrientes. Além disso, a citocina antiinflamatória IL-10 regulada por glucanos que inibe a proliferação de células T e a diferenciação funcional, incluindo a secreção de citocinas Th1 e Th2, que simultaneamente exibe a via de transdução de sinal de NF- κ B (Clarke et al., 1998). Li et al. (2006) sugeriram que a suplementação da dieta de suínos com glucanos pode suprimir a imunidade celular, o que reflete na melhoria do desempenho.

Adicionalmente, um estudo demonstrou que a suplementação com β -glucanos influenciou particularmente a expressão de fenótipos de linfócitos, proliferação de células linfóides em resposta à estimulação *ex vivo* da adesão de *Escherichia coli* enterotoxigênica a enterócitos. A proporção de subpopulações de células T CD4 nos linfonodos mesentéricos,

placas de Peyer e células T CD8 no sangue periférico foi maior em leitões alimentados com β -glucanos. Os autores concluíram que uma maior ingestão nutricional de glucanos resultou em um aumento de leucócitos do sangue periférico e, especificamente, aumentou a contagem de células T virgens.

Em contrapartida, Sauerwein et al. (2007) ao avaliarem os efeitos da suplementação com parede celular de leveduras sobre o sistema imune de leitões pós-desmame não observaram efeito imunomodulatório, bem como melhorias no desempenho. A divergência quanto a efetividade da suplementação de β -glucanos sobre o desempenho de leitões pós-desmame podem estar relacionadas às propriedades físico-químicas destes prebióticos que apresentam efeitos biológicos divergentes, dependendo das estruturas de ramificação e dos pesos moleculares (Vetvicka et al., 2014).

Os mananoligossacarídeos (MOS) são carboidratos não digestíveis compostos por blocos de manose e podem ser encontrados na parede celular de levedura em formação complexa. *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada nas indústrias de panificação e cervejaria e a partir destes processos obtêm-se exclusivamente os MOS que são utilizados na nutrição animal (Halas e Nochta, 2012). A parede celular de *S. cerevisiae* contém manana-proteínas e glucanas, os principais constituintes da parede celular externa são polímeros de manana com ligações $\alpha(1-6)$ e $\alpha(1-2)$ ou, em menor extensão $\alpha(1-3)$ de cadeias laterais limitadas.

No epitélio intestinal, as enzimas do animal não são capazes de clivar essas ligações e, portanto, os MOS não têm valor nutritivo direto, mas demonstrou sua efetividade na manutenção da saúde intestinal (Spring, 1999).

Estudos *in vitro* evidenciam que, na presença de manano, certos patógenos entéricos gram-negativas com fímbrias tipo-1 específicas para manose, como *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*, se ligam por meio de fímbrias aos compostos de manana. Tal fato pode reduzir a colonização do epitélio intestinal por estes microrganismos, uma vez que as fímbrias estarão ocupadas e não se ligarão aos carboidratos de membrana do epitélio intestinal, posteriormente inibindo a produção de metabólitos tóxicos que promovem danos no epitélio intestinal. A fixação destas bactérias no epitélio intestinal ocorre através da interação entre as fímbrias e as glicoproteínas da superfície de enterócitos, que são ricas em manose (receptores de lecitina) (Firon et al., 1983). Alguns resultados sugerem que a suplementação dietética de MOS pode reduzir o número de bactérias nocivas no intestino grosso se a exposição ao patógeno for elevada, como na pós-infecção (White et al., 2002; Burkey et al., 2004; Liu et al., 2008; Castillo et al., 2008).

Em contrapartida, outros estudos não comprovaram que o número de patógenos (facultativos) foi de fato afetado pelos MOS dietético (Van der Peet-Schwering, et al., 2007). Dependendo da sua estrutura química (ligações e proporção de manose), a eficiência dos produtos de manano pode diferir em relação ao seu potencial para moderar a proliferação de *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (Singbroota, 2005).

O MOS dietético pode agir de forma indireta ou diretamente sobre o sistema imune. Tendo em vista que, a microbiota pode modular a imunidade local do hospedeiro, o deslocamento induzido pelos MOS na microbiota intestinal pode resultar em alterações de determinadas variáveis imunológicas (Halas e Nochta, 2012). Estudos recentes relatam que a inclusão de produtos de manano na dieta aumenta diretamente a competência imunológica de suínos, particularmente de fêmeas e leitões pós-desmame (Halas e Nochta, 2012). Estudos com camundongos, cães e aves constataram que o MOS dietético aumenta a IgA secretora em diferentes segmentos da mucosa intestinal (O'Carra, 1997; Kudoh et al., 1999; Swanson et al., 2002). O aumento da produção de IgA da mucosa é provavelmente atribuível a uma ativação da defesa imunológica local através dos receptores de ligação à manose localizados na superfície do intestino.

Em uma revisão sistemática Halas e Nochta (2012) afirmam que é provável que os MOS auxiliem na manutenção da integridade intestinal e, conseqüentemente, na função digestiva e absorptiva do intestino após o desmame. Portanto, a síndrome de má absorção associada a esse período pode ser aliviada com a suplementação dietética de MOS. Além disso, os autores sugerem que o MOS aumenta a resistência a doenças em suínos, promovendo a apresentação de antígenos, aumentando assim a mudança de uma resposta imune inata para uma adaptativa. Sendo assim, a suplementação dietética de MOS pode ter um efeito promotor de crescimento em suínos mantidos em más condições higiênicas, enquanto o efeito positivo de MOS não é observado em rebanhos de suínos saudáveis com altos padrões de higiene que são capazes de manter sua alta taxa de desempenho pós-desmame.

2.4.Extrato Pirolenhoso

O extrato pirolenhoso (EP) é obtido após a produção do carvão vegetal, a partir da condensação da fumaça formada pela carbonização da biomassa da madeira. Durante a produção de carvão ocorre a pirólise lenta, a qual atinge temperaturas superiores a 300 °C, com taxa de aquecimento inferior a 80 °C/min. (Williams & Besler, 1996). A biomassa é constituída, em grande parte, por celulose, hemicelulose e lignina, biopolímeros complexos que são submetidos a várias transformações quando submetidos a elevação da temperatura. Acima de

400°C os componentes menos voláteis que compõem carvão sólido são gradualmente expelidos, produzindo assim um produto que tem um maior teor de carbono fixo e um menor teor de carbono volátil. A fumaça, percorre um cano com comprimento superior a 10 metros e, ao longo do percurso, ocorre condensação dos vapores condensáveis. O líquido pirolenhoso obtido fica em repouso durante três meses para que ocorra a decantação e purificação natural, resultando em um composto dividido em três fases: o óleo, na fase superior; o EP líquido, translúcido de coloração amarela a marrom avermelhada na fase intermediária e o alcatrão vegetal, de consistência pegajosa e coloração escura na parte inferior (Wei et al., 2010).

O EP também conhecido como vinagre de madeira, ácido pirolenhoso e mokusaku possui diversas formas de aplicação, dentre elas a agrícola, é composto por água em sua maior parte (80 a 90% v/v) e uma mistura complexa de milhares de compostos, contendo nesses mais de 200 compostos orgânicos decorrentes da degradação térmica da madeira, como ácido acético, álcoois, acetonas, ésteres e furanos. Além destes cita-se número significativo de compostos resultantes da degradação térmica da lignina tais como fenol, guaiacol, siringol, pirocatecol e derivados (Fengel & Wegener, 1983; Shafizadeh, 1984; Guillén & Ibargoitia, 1996, 1998, 1999; Adriansz et al., 2000; Guillén et al., 2001; Guillén & Manzanos, 2002; Wei et al., 2010).

A composição química e concentração de compostos do EP dependem intrinsecamente de qual material original é carbonizado (Pimenta et al., 2000; Nakai et al., 2007; Rakmai 2009; Souza et al., 2012). O EP obtido a partir de *Eucalyptus urograndis* caracteriza-se pela presença de altos teores de guaiacol e seus derivados que, juntamente com outros fenóis e furfural podem explicar as atividades antibacterianas e antifúngicas (Araújo et al., 2017).

Guaiacol é usado medicinalmente como um expectorante, anti-séptico e anestésico local. O fenol apresenta valor terapêutico como fungicida (O'neil, 2013). O cresol é usado como antisséptico local, parasítico, desinfetante e como antisséptico intestinal (O'neil, 2013). Furfural (2-furaldeído) é encontrado na pimenta da Jamaica, é um ingrediente flavorizante e pode atuar como fungicida (Abdel-Kahr et al., 2015), além disso, o furfural também possui atividade nematicida (Ismail & Mohamed, 2007; Crow & Luc 2014).

Provavelmente, as propriedades antibacterianas e antifúngicas do EP de diferentes fontes não podem ser atribuídas a um único composto, mas a uma combinação de vários, como apontado por Yang et al. (2016). Tal fato foi constatado no trabalho de Choi et al. (2009), que avaliaram o efeito dos níveis de inclusão (0,1; 0,2 e 0,3%) do extrato de *Quercus acutissima* em dietas para leitões pós-desmame, sobre o desempenho, digestibilidade e diversidade microbiana. Os autores verificaram uma melhoria nas variáveis analisadas e atribuíram essa

melhora aos ácidos orgânicos (3,99% ácido acético e 10,89% ácido propiônico) presentes no EP.

Vale ressaltar que, outros trabalhos observaram o efeito benéfico da adição de EP na nutrição de animais monogástricos. Como relatado por Ahn (2005) a adição em proporção de 0,2% na ração de leitões pós-desmame resultou no aumento da eficiência alimentar, melhora na digestibilidade de nutrientes e redução de coliformes intestinais prejudiciais. Em estudo utilizando a mesma concentração de EP em frangos de corte, Shim (2010) relatou redução na emissão de gases tóxicos nas excretas, além de observar efeitos positivos nos parâmetros qualitativos da carne.

Diante do exposto, e da escassez de estudos científicos explorando a utilização do EP de *Eucalyptus urograndis* como fonte alternativa à substituição de antibióticos como melhoradores de desempenho e de marcadores da saúde intestinal, estudos são necessários para verificar o seu potencial na dieta de leitões recém-desmamados.

Referências

- Abdel-Kahr, M.M., Hamman, M.M.A., El-Mougy, N.S., Abd-Elgawad, M.M.M., 2015. Pesticide alternatives for controlling root and root knot of cucumber under plastic house conditions. *Int. J. Innov. Research Sci.* 4, 25–31.
- Adriansz, T.D., Rummey, J.M., Bennett, I.J., 2000. Solid phase extraction and subsequent identification by gas-chromatography-mass spectrometry of a germination cue present in smoke water. *Analytical Letters.* 33, 2793- 2804.
- Ahn, B.J., Jo, T.S., Cho, S.T., Choi, D.H., Hwang, S.G., Kim, J.M., 2005. Effect of dietary moghotan supplementation on fattening performance, fatty acid composition and meat quality in pigs. *Kor. J. Organ. Agricul.* 13, 401-412.
- Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., 2019 Prebiotics and Probiotics in Feed and Animal Health. Em: Gupta R, Srivastava A, Lall R. (eds). *Nutraceuticals in Veterinary Medicine.* Madri: Springer; 261 – 285.
- Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Cohen, M.L., 1998. Significance and Sources of Antimicrobials in Swine Production. *The Bov. Product.* 31, 1-8.
- Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), 1996. Part 11: Reference of 1995 U.S. Grower/Finisher Health K: Management Practices. Washington. DC: United States Department of Agriculture.

- Araújo, E. S., Pimenta, A. S., Feijó, F.M.C., Castro, R.V.O., Fasciotti, M., Monteiro, T.V.C., Lima, K.M.G., 2017. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. *J. Appl. Microbiol.* 124, 85-96.
- Argüello, H., Estellé, J., Zaldívar-López, S., Jiménez-Marín, A., Carvajal, A., López-Bascón, M.A., Crispie, F., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Priego-Capote, F., Morera, L., Garrido, J.J. 2018. Early *Salmonella typhimurium* infection in pigs disrupts microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Sci Rep.* 8, 77-88.
- Belobrajdic, D.P., Jobling, S.A., Morell, M.K., Taketa, S., Bird, A.R., 2015. Whole grain barley β -glucan fermentation does not improve glucose tolerance in rats fed a high-fat diet. *Nutr. Res.* 35, 162-168.
- Benková, M., Boroskova, Z., Soltys, J., Dubaj, J., Szechenyi, S., 1992 Effect of glucan preparation on immunocompetent cells and phagocytic ability of blood leucocytes in experimental ascariasis of pigs. *Vet. Parasitol.* 41, 157-166.
- Bian, G., Ma, S., Zhu, Z., Su, Y., Zoetendal, E.G., Mackie, R., Liu, J., Um, C., Huang, R., Smidt, H., Zhu, W., 2016. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environ Microbiol.* 18, 1566–1577.
- Bomba, A., Jonecova, Z., Koscova, J., Nemcova, R., Gancarikova, S., Mudronova, D., Scirankova, L., Buleca, V., Lazar, G., Posivak, J., Kastel, R., Marekova, M., 2006. The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. *Biol.* 61, 729–734.
- Burkey, E.T., Dritz, S.S., Nietfeld, B.J., Johnson, J.B., Minton, J.E., 2004. Effect of dietary mannanoligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J. Anim. Sci.* 82, 397-404.
- Campbell, J. M., Crenshaw, J.D., Polo, J., 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 19.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G., Gasa, J., 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet Microbiol.* 124, 239–247.

- Castillo M., Martin-Orue, S.M., Taylor-Pickard, J.A., Perez, J.F., Gasa, J., 2008 Use of mannan-oligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *J. Anim. Sci.* 86, 94–101.
- Chae, J.P., Pajarillo, E.A., Oh, J.K., Kim, H., Kang, D.K., 2016. Revealing the combined effects of lactulose and probiotic enterococci on the swine faecal microbiota using 454 pyrosequencing. *Microb Biotechnol.* 9, 486–495.
- Chen, Y.J., Kwon, O.S., Min, B.J., Son, K.S., Cho, J.H., Hong, J.W., Kim, I.H., 2005. The effects of dietary Biotite V supplementation as an alternative substance to antibiotics in growing pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 18, 1642–1645.
- Choi J.Y., Shinde P.L., Kwon I.K., Song Y.H., Chae B.J., 2009. Effect of Wood Vinegar on the Performance, Nutrient Digestibility and Intestinal Microflora in Weanling Pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2, 267-274.
- Cromwell, G.L., 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.*, 13, 7–27.
- Crow, W.T., Luc, J.E., 2014. Field efficacy of furfural as a nematicide on turf. *J. Nematol.* 46, 8–11.
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huërou-Luron, I.L., Abdennebi-Najar, L., 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning Diarrhoea. *PLoS One.* 12: e0169851.
- Drumo, R., Pesciaroli, M., Ruggeri, J., Tarantino, M., Chirullo, B., Pistoia, C., Petrucci, P., Martinelli, N., Moscati, L., Manuali, E., Pavone, S., Picciolini, M., Ammendola, S., Gabai, G., Battistoni, A., Pezzotti, G., Alborali, G.L., Napolioni, V., Pasquali, P., Magistrali, C.F., 2015. *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* exploits inflammation to modify swine intestinal microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 5, 106.
- Dutra, M.C., 2017. Uso de antimicrobianos em suinocultura no Brasil: análise crítica e impacto sobre marcadores epidemiológicos de resistência. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.

- Firon, N., Ofek, I., Sharon, N., 1983. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Research* 120, 235–249.
- Forbes, J. M., 1995. Environmental factors affecting feed intake. In: *Voluntary Intake and Diet Selection in Farm Animals*. Wallingford, UK: CAB 332–353.
- Gaggìa, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 15-28.
- Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington R., 2010. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bullet.* 7, 1 – 19.
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E, Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P.D., Verbeke, K. Reid, G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 14, 491-502.
- Gimsa, U., Tuchscherer, M., Kanitz, E., 2018. Psychosocial stress and immunity: what can we learn from pig studies. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 64.
- Guevarra, R.B., Lee, J.H., Lee, S.H., Seok, M.J., Kim, D.W., Kang, B.N., Johnson, T.J., Isaacson, R.E., Kim, H.B., 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *J Anim Sci Biotechnol.* 10, 308-318.
- Guillén, M.D., Ibargoitia, M.L., 1999. GC/MS analysis of lignin monomers, dimers and trimers in liquid smoke flavourings. *J. Sci. Food Agricul.* 79, 1889-1903.
- Guillén, M.D., Manzanos, M.J., Ibargoitia, M.L., 2001. Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavourings. *J. Agricul. Food Chem.* 49, 2395-2403.
- Guillén, M.D., Manzanos, M.J., 2002. Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chemist.* 79, 283-292.
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Wiele, t. v., Frano, E., Blanquet-Diot, S., 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: Understanding the Keys to health. *Trends Microbiol.* 25, 851-873

- de Groot, J., Ruis, M. A. W., Scholten, J. W., Koolhaas, J. M., Boersma, W. J. A., 2001. Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Phys. & Behav.* 73, 145–158.
- Halas, V., Nocht, I., 2012. Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals.* 23, 261–274.
- Ismail, A.E., Mohamed, M.M., 2007. Effect of different concentrations of furfural as botanical nematicide and the application methods in controlling *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* infecting. *Pakist. J. Nematol.* 25, 45–52.
- Jiang, C., Wang, P., Li, M., Liu, S., Zhang, S., 2016. Dietary β -glucan enhances the contents of complement component 3 and factor B in eggs of zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 107–113.
- Johnson, R.W., 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view. *J Anim. Sci.* 75, 1244–1255.
- Kim, H.B., Borewicz, K., White, B.A., Singer, R.S., Sreevatsan, S., Tu, Z.J., Isaacson, R.E., 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet Microbiol.* 153, 124–133.
- Kogan, G., Kocher, A., 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest Sci.* 109, 161–165.
- Kudoh, K., Shimizu, J., Ishiyama, A., Wada, M., Takita, T., Kanke, Y., Innami, S., 1999. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *J. Nut. Sci. Vitaminol.* 45, 173–81.
- Lallès, J.P., Boudry, G., Favier, C., Le Floch, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I.P., Pié, S., Piel, C., Sève B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res.* 53, 301–316.
- Lee, S.I., Kim, J.K., Hancock, J.D., Kim, I.H., 2017. β -glucan from mulberry leaves and curcuma can improve growth performance and nutrient digestibility in early weaned pigs. *J Appl. Anim. Res.* 45, 209–214.
- Li, J., Li, D. F., Xing, J. J., Cheng, Z. B., Lai, C. H., 2006. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 84, 2374–2381.

- Liu, P., Piao, X.S., Kim, S.W., Wang, L., Shen, Y.B., Lee, H.S., 2008. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *J. Anim. Sci.* 86, 2609-2618.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168.
- Lu, X., Zhang, M., Zhao, L., Ge, K., Wang, Z., Jun, L., Ren, F., 2018. Growth performance and post-weaning diarrhea in piglets fed a diet supplemented with probiotic complexes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1791–1799.
- Ma, T., Tu, Y., Zhang, N., Guo, J., Deng, K., Zhou, Y., Yun, Q., Diao, Q., 2015. Effects of dietary yeast β -glucan on nutrient digestibility and serum profiles in pre-ruminant Holstein calves. *J Integr. Agric.* 14, 749-757.
- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., 1999. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. Em: PHILLIPS, S.F., PEMBERTON, J.H., SHORTER, R.G. (Eds.). *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. Nova York: Raven Press, 51–94.
- Magnani, M., Castro-Gómez, R.J.H., 2008. β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. *Semina*, 29, 631-650.
- MAPA. Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021.
- Maron, D.F., Smith, T.J.S., Nachman, K.E., 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: An international regulatory and economic survey. *Global. Health.* 9 - 48.
- McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R., 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr.* 129, 613–619.
- McKay, D.M., Baird, A.W., 1999. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut*, 44:282–289.

- Mereu, A., Tedó, G., Moeser, A. J., Rimbach, G., Ipharraguerre, I. R., 2015. Cromolyn-mediated improvement of intestinal barrier function is associated with enhanced piglet performance after weaning. *Vet. Res.* 11, 274.
- Moeser, A.J., Pohl, C. S., Rajput, M., 2017. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim. Nutr.* 3, 313–321.
- Molnar, C., Gair, J., 2015. *Concepts of Biology – 1st Canadian Edition*. BCcampus. 1181p.
- Morés, N. 2014. É possível produzir suínos sem o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho? In: VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal - CBNA. 7-12.
- National Research Council. *Costs of Eliminating Subtherapeutic Use of Antibiotics. The use of drugs in food animals: Benefits and risks.* 151-159. Washington, DC, National Academy Press.
- Nakai, T., Kartal, N., Hata, T., Imamura, Y., 2007. Chemical characterization of pyrolysis liquids of woodbased composites and evaluation of their bio-efficiency. *Build. Environ.* 42, 1236–1241.
- O'Carra, R., 1997. An assessment of the potential of mannan oligosaccharides as immunostimulants. MsC. Thesis, National University of Ireland, Galway, Ireland.
- O'neil, M.J., 2013. *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Pajarillo, E.A., Chae, J.P., Balolong, M.P., Kim, H.B., Seo, K.S., Kang, D.K., 2014. Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. *J Microbiol.* 52, 646–651.
- Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I.P., 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr.* 134, 641–647.
- Pimenta, A.S., Bayona, J.M., Garcia, M.T., Solanas, A.M., 2000. Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from *Eucalyptus grandis* wood pyrolysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 169–177.

- Pollock, J., Gally, D.L., Glendinning, L., Tiwari, R., Hutchings, M.R., Houdijk, J.G.M., 2018. Analysis of temporal fecal microbiota dynamics in weaner pigs with and without exposure to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci.* 96, 3777–3790.
- Pluske, J.R., Turpin, D.L., Kim, J.C., 2018. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutr.* 4, 187–196.
- Pluske, J.R., Miller, D.W., Sterndale, S.O., Turpin, D.L., 2019. Associations between gastrointestinal-tract function and the stress response after weaning in pigs. *Anim. Prod. Sci.* 59, 2015-2022.
- Rakmai, J., 2009. Chemical determination, antimicrobial and antioxidant activities of Thai wood vinegars. MSc Thesis, Prince of Songkhla University, Songkhla, Thailand.
- Robertsen, B., 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 269–290.
- Sauerwein, H., Schmidz, S., Hiss, S., 2007. Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance on weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 91, 369-380.
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Sansonetti, P.J., Cerf-Bensussan, N., 2017. Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. *Curr Opin Microbiol.* 35, 100 - 109.
- Shafizadeh, F., 1984. The chemistry of solid wood. Washington, DC: American Chemical Society.
- Shim K.S., Ji, J.R., Na C.S., Park, J.H., 2010. Effect of Pyroligneous Acid Supplementation on Growth Performance, Blood Parameter, Ammonia Gas Emission and Fatty Acid Composition of Breast Meat in Korean Native Chicken. *J. Poultry Sci.* 37, 207-213.
- Singbroota, P., 2005. Agglutination of Type-1 Fimbrial Bacteria by Different Yeast Cell Wall Products. Ph.D. Thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, Capítulo 1: 41-63.
- Souza, J.B.G., Ré-poppi, N. and Raposo, J.L. Jr, 2012. Characterization of pyroligneous acid used in agriculture by gas chromatography-mass spectrometry. *J Braz. Chem Soc* 4, 610–617.

- Spring, P., 1999. Mannan-oligosaccharides as an alternative to antibiotic use in Europe. *Zootech Int.* 22: 38-41.
- Spurlock, M. E., 1997. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: An overview of cytokine function. *J Anim. Sci.* 75, 1773–1783.
- Squires, J. E., 2010. *Applied animal endocrinology*. 2nd ed., CABI: Wallingford, UK, 312p.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Healy, H.P., Dawson, K.A., Merchen, N.R., Fahey, G.C., 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J. Nutr.* 132, 980-989.
- Tajima, K., Ohmori, H., Tohno, M., Ohtsu, H., Tsukahara, T., Aminov, R., 2013. Segmented filamentous bacteria are a major group in terminal ileum of piglets. *Anaerobe.* 23, 109 – 111.
- Tian, X., Shao, Y., Wang, Z., Guo, Y., 2016. Effects of dietary yeast β -glucans supplementation on growth performance, gut morphology, intestinal *Clostridium perfringens* population and immune response of broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 215,144-155.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 5649–5654.
- De Vrese, M., Schrezenmeir, J., 2008. Prebiotics. In: Stahl U., Donalies U.E., Nevoigt E. (eds) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Berlin, Heidelberg: Springer; 33 – 45.
- Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zrally, Z., Pavlik, I., 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Vet. Med.* 55, 199–224.
- Wei, Q., Ma X., Dong J., 2010. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 87, 24-28.
- Whittemore, C. T., Green, D. M., 2006. Growth of the young weaned pig. In: *The Weaner Pig*, edited by Varley MA and Wiseman J. Wallingford, UK: CAB, 1–15.

- White, L.A., Newman, M.C., Cromwell, G.L., Lindemann, M.D., 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 80, 2619-2628.
- Williams, P.T., Besler S., 1996. The influence of temperature and heating rate on the slow pyrolysis of biomass. *Renew Energy.* 7, 233-250.
- Winter, S.E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Thiennimitr, P., Poon, V., Keestra, A.M., Laughlin, R.C., Gomez, G., Wu, J., Lawhon, S.D., Popova, I.E., Parikh, S.J., Adams, L.G., Tsolis, R.M., Stewart, V.J., Bäumlér, A.J., 2013. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science.* 339, 708–711.
- World Health Organization (WHO), 2018. Critically important antimicrobials for human medicine, 5th revision. World Health Organization.
- Yang, J., Yang, C., Liang, M., Gao, Z., Wu, Y., Ghuang, L., 2016. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi sinensis*. *Molecules.* 21, 1–10.
- Yang, Q, Huang, X., Zhao, S., Sun, W., Yan, Z., Wang, P., Li, S., Huang, W., Zhang, S., Liu, L., Gun, S., 2017. Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets. *Front Microbiol.* 8, 502.
- Zeng, M.Y., Inohara, N., Nunez, G., 2017. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* 10, 18–26.

3. USO DE BETA 1,3-1,6 GLUCANOS E MANANOLIGOSSACARÍDEO SOLÚVEL NA DIETA DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, MORFOLOGIA INTESTINAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de β -glucanos e mananoligossacarídeos (MOS), em substituição aos antibióticos promotores do crescimento (APC) em dietas para leitões recém desmamados, sobre o desempenho, incidência de diarreia, morfologia intestinal e parâmetros de resposta imune (Imunoglobulinas A, G e M) e sanguíneos. Foram utilizados 250 leitões (150 machos e 100 fêmeas), com $6,49 \pm 0,79$ kg, alojados em grupos de 5 animais por baia e submetidos aos tratamentos: Controle, sem aditivo zootécnico; Controle + 50 mg de β -glucano/ kg (BG50); Controle + 100 mg de β -glucano/kg (BG100); Controle + 500 mg de MOS /kg (dieta MOS); e Controle + 120 ppm de Halquinol (HALQ). Fezes de suínos adultos diluídas em água (1:5) foram aspergidas sobre as baias antes do alojamento, como desafio sanitário aos leitões. Não foram observados efeitos dos tratamentos sobre o desempenho e a incidência de diarreia. Contudo, os animais alimentados com BG100 apresentaram tendência ($P = 0,0624$) para maior ganho diário de peso em relação aos leitões submetidos a dieta controle (264.1 vs. 213.4g/dia), de 8 a 14 dias do experimento. Não houve efeito da suplementação sobre a morfologia intestinal e os parâmetros hematológicos. Entretanto, os leitões alimentados com dieta BG50 apresentaram concentração de neutrófilos 20% maior ($P < 0,05$) em comparação aos animais que receberam a dieta controle no dia 21 e, além disso, a inclusão de MOS nas dietas aumentou ($P < 0,05$) a concentração de linfócitos em 22% no soro sanguíneo dos animais do grupo controle, em comparação ao grupo BG50. A concentração de IgA no soro sanguíneo dos animais controle foi duas vezes maior ($P < 0,05$) em comparação ao grupo alimentado com a dieta BG100 no dia 7. Embora não estatisticamente diferentes, os leitões alimentados com as dietas BG50, BG100, MOS e HALQ apresentaram concentração de IgA na mucosa intestinal de 2,1 a 2,7 vezes maior ($P > 0,05$) em comparação aos animais alimentados com a dieta controle. A suplementação com β -glucanos ou MOS não foi efetiva na melhoria do desempenho e controle da diarreia dos leitões pós-desmame. Porém, mais estudos são necessários para elucidar os níveis e seus efeitos sobre o sistema imunológico em leitões pós-desmame.

Palavras-chave: prebióticos; suínos, saúde intestinal, sistema imunológico.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of supplementation of β -glucans and mannanoligosaccharides (MOS), replacing growth-promoting antibiotics (GPA) in diets for weanling piglets, on growth performance, diarrhea incidence, intestinal morphology and parameters of immune response (Immunoglobulins A, G and M) and blood. Two hundred and fifty (150 males and 100 females) 6.49 ± 0.79 kg piglets were housed in groups of 5 animals per pen and submitted to the following treatments: Control, without growth promoter feed additive; Control + 50 mg β -glucan/kg (BG50); Control + 100 mg β -glucan/kg (BG100); Control + 500 mg MOS/kg (MOS diet); and Control + 120 ppm Halquinol (HALQ). Adult swine feces diluted in water (1:5) were sprinkled over the pens before housing, as a sanitary challenge to the piglets. There were no treatment effects on growth performance and diarrhea incidence. However, animals fed BG100 tended ($P = 0.0624$) to have greater average daily gain compared to piglets fed control diet (264.1 vs. 213.4g/day), from 8 to 14 days of the experiment. There was no effect of prebiotics supplementation on intestinal morphology and hematological parameters. However, piglets fed BG50 diet had 20% greater neutrophil concentration ($P < 0.05$) compared to animals that received the control diet on day 21 and, in addition, the inclusion of MOS in the diets increased ($P < 0.05$) the lymphocyte concentration in 22% in the blood serum of animals compared to the BG50 group. The IgA concentration in the blood serum of the control animals was twice as high ($P < 0.05$) compared to the group fed the BG100 diet on day 7. Although not statistically different, the piglets fed BG50, BG100, MOS and HALQ diets presented IgA concentration in the intestinal mucosa from 2.1 to 2.7 times greater ($P > 0.05$) compared to animals fed the control diet. Supplementation with β -glucans or MOS was not effective in improving performance and controlling diarrhea in post-weaning piglets. However, more studies are needed to elucidate the levels and their effects on the immune system in post-weaning piglets.

Keywords: immune system, intestinal health, pigs, prebiotics.

3.1. Introdução

O processo de desmame precoce é um dos eventos mais estressantes aos animais na suinocultura intensiva, que pode contribuir para disfunções intestinais e do sistema imunológico de leitões que resultam em comprometimento da saúde, e em reduções na ingestão de alimentos e no crescimento, especialmente durante a primeira semana após o desmame (Campbell et al, 2013). Uma das estratégias para se evitar ou minimizar tais problemas é a inclusão nas dietas de antibióticos como promotores de crescimento (APC), ou de aditivos antimicrobianos como o óxido de zinco (ZnO), que promovem melhorias na taxa de crescimento, bem como, na eficiência de utilização dos alimentos, reduzindo a mortalidade e a morbidade (Cromwell, 2002).

Tradicionalmente, os APC e o ZnO têm sido incorporados à dieta de leitões pós-desmame, para controlar a incidência de diarreia e promover melhorias no desempenho, com resultados satisfatórios. No entanto, o possível aumento da resistência microbiana decorrente do uso de APC levou à sua proibição em 2006 na União Europeia (UE) (Regulamento CE nº 1831/2003). Da mesma forma, a UE irá proibir doses farmacológicas de ZnO a partir de 2022 devido ao risco de acumulação ambiental e sua associação com resistência microbiana (Long et al., 2017). A Food and Drug Administration dos EUA impôs restrições ao uso de antibióticos em animais em dezembro de 2016 e a Health Canada proibiu o uso de antibióticos na dieta de animais em 2017, com mais países a serem seguidos. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento também restringiu diversos antimicrobianos com finalidades de promotores de crescimento (Dutra, 2017) e em 23 de Janeiro de 2020, o MAPA publicou a instrução normativa (IN) Nº 1 (13/01/2020), proibindo em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana.

Diante disso, é fundamental desenvolver alternativas aos antibióticos para garantir a sustentabilidade de longo prazo da produção de suínos. Dentre as potenciais alternativas se destacam os probióticos, prebióticos, enzimas, acidificantes, extratos de plantas e nutracêuticos, como cobre (Li et al., 2012; Wang et al., 2012; Zuo et al., 2015; Long et al., 2018; Lu et al., 2018; San Andres et al., 2019).

Os prebióticos são caracterizados como substratos seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota do trato gastrointestinal (TGI), conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (Gibson et al., 2010). A

maioria dos prebióticos identificados são carboidratos com diferentes estruturas moleculares que ocorrem naturalmente na alimentação humana e animal, como os oligossacarídeos não digestíveis (Gaggia et al., 2010), dentre os quais destacam-se: β -glucanos, frutoligosacarídeos (FOS), galactoligosacarídeos (GOS) e mananoligosacarídeos (MOS) (Gibson et al., 2010).

Os β -glucanos constituem um promissor grupo de prebióticos, sendo unidades estruturais básicas das paredes celulares de plantas superiores, algas, fungos, leveduras e várias espécies bacterianas. Eles são compostos por D-glicose unidas por ligações glicosídicas em várias conformações (Pretus et al., 1991). A molécula de β -glucano é considerada imunomoduladora, capaz de alterar respostas biológicas, uma vez que possui a capacidade de ligação com receptores de membrana específicos de células fagocíticas, potencializando a sua eficácia (Robertsen, 1999). Além do efeito imunomodulador, o β -glucano é fermentado seletivamente por bactérias benéficas no TGI do animal, controlando, de forma indireta, o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e a saúde intestinal (Pretus et al., 1991).

Os MOS são carboidratos não digestíveis compostos por manose e podem ser encontrados na parede celular de levedura em formação complexa. A parede celular de *S. cerevisiae* contém manana-proteínas e glucanas, os principais constituintes da parede celular externa são polímeros de manana com ligações $\alpha(1-6)$ e $\alpha(1-2)$ ou, em menor extensão $\alpha(1-3)$ de cadeias laterais limitadas. Halas & Nochta (2012) relatam que a inclusão de MOS na dieta aumenta diretamente a competência imunológica de suínos, particularmente de fêmeas e leitões recém-desmamados. Em estudos com camundongos, cães e aves verificaram-se que o MOS dietético aumentou a secreção de IgA em diferentes segmentos da mucosa intestinal (O'Carra, 1997; Kudoh et al., 1999; Swanson et al., 2002). O aumento da produção de IgA da mucosa pode ser atribuível à ativação da defesa imunológica local através dos receptores de ligação à manose localizados no epitélio intestinal. Além disso, Davis et al. (2004) relataram que 21 dias de alimentação com 2 g de manana fosforilada por kg de dieta alteraram o complexo de linfócitos T da lâmina própria do jejuno de leitões pós-desmame.

Ao avaliarem a efeitos da suplementação de 1000, 2000 e 3000 mg/kg de MOS, glucomananas e β -glucanos, Anjos et al. (2019) constataram que níveis elevados (3000 mg/kg) de prebióticos não são uma alternativa viável aos antimicrobianos em promover melhorias sob o desempenho na dieta de leitões recém-desmamados. Ao passo que, Hiss & Sauerwein (2003) avaliaram o efeito da suplementação de 0, 0.015 e 0.03% de β -glucano para leitões recém-desmamados durante quatro semanas e observaram os benefícios da suplementação de β -glucano sobre o desempenho, porém nenhum efeito sobre os parâmetros imunológicos testados. Além disso, os autores observaram tendência no aumento do consumo de ração. Por fim, Van

der Peet-Schwering et al. (2007) avaliaram efeitos da cultura de levedura (YC) e cultura de levedura modificada (YC + produto da parede celular (CWP) contendo mananoglicosacarídeos) em dietas para leitões após o desmame e sugeriram que a cultura de levedura poderia ser uma alternativa aos antibióticos nas dietas de leitões desmamados e que a adição de CWP às dietas contendo YC não promoveu melhorias sobre o desempenho ou a saúde dos leitões desmamados em comparação aos leitões alimentados com dietas contendo apenas YC.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de β -1,3/1,6 glucano e MOS sobre desempenho, morfologia intestinal e na resposta imune de leitões pós-desmame durante seis semanas.

3.2. Material e métodos

O presente estudo foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” (ESALQ) – Universidade de São Paulo (USP) (SP, Brasil) sob o protocolo de número 2017.5.1623.11.2. O experimento foi realizado no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, SP, Brasil, para avaliar o desempenho, morfometria intestinal e marcadores da resposta imune em suínos pós-desmame.

3.2.1. Animais, instalações e dietas experimentais

Duzentos e cinquenta suínos (150 machos castrados e 100 fêmeas), mestiços (PIC), recém-desmamados com 21 dias de idade e $6,5 \pm 0,8$ kg de peso vivo foram obtidos de uma granja de suínos comercial (Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) e transportados para as instalações experimentais da Esalq – USP. Os animais foram divididos em dois grupos de 125 e alojados em grupos de cinco (três machos castrados e duas fêmeas) por baia, em dois períodos diferentes, em um galpão com 25 baias suspensas, de $1,8 \text{ m}^2$ ($1,20 \times 1,50$ m) cada, com piso parcialmente ripado, contendo um bebedouro tipo chupeta e um comedouro semiautomático.

A fim de garantir o conforto térmico, cada baia continha uma lâmpada infravermelha (250 W) como fonte de calor e realizou-se o controle da temperatura a partir da abertura e fechamento das cortinas laterais do barracão experimental. Ao longo dos 42 dias experimentais registrou-se a temperatura ambiental, uma vez ao dia, no interior das salas por meio da leitura dos termômetros da temperatura máxima e mínima.

Os animais foram submetidos a um programa de alimentação em 3 fases (Tabela 1): pré-inicial (1 a 7 dias de experimento), inicial I (8 a 21 dias de experimento) e inicial II (22 a 42 dias de experimento), para atender as exigências nutricionais de suínos de acordo com as

recomendações do NRC (2012). As dietas foram compostas oferecidas *ad libitum* ao longo do período experimental e consistiram em: Controle, sem qualquer antimicrobiano; BG50: dieta controle com 50 mg de β -glucanos por tonelada de ração; BG100: dieta controle com 100 mg de β -glucanos por tonelada de ração; MOS: dieta controle com 500 mg de manoligossacarídeo solúvel por tonelada de ração; Halq: dieta controle com 120 ppm do antibiótico Halquinol.

Tabela 1: Ingredientes e composição centesimal das dietas experimentais

Fases Ingredientes, %	Pré-inicial	Inicial I	Inicial II
Milho	46,655	55,134	62,297
Farelo de soja	25,000	28,000	30,000
Soro de leite em pó	13,517	5,406	-
Concentrado proteico de soja	7,512	2,405	-
Açúcar	2,500	4,000	4,000
Óleo de soja	0,895	1,032	0,161
Calcário	0,817	0,806	0,817
Fosfato bicálcico	1,312	1,345	1,083
Sal	0,599	0,662	0,610
Premix vitamínico	0,150	0,150	0,150
Premix mineral	0,100	0,100	0,100
L - Lisina HCl	0,496	0,518	0,454
DL – Metionina	0,235	0,201	0,153
L – Treonina	0,149	0,157	0,136
L – Valina	0,045	0,066	0,024
L – Triptofano	0,003	0,003	-
Antioxidante	0,015	0,015	0,015
Valores calculados			
Energia líquida, Mcal/kg	2,45	2,45	2,41
g Lisina digestível / Mcal EL	6,13	5,51	5,51
Proteína bruta, %	22,59	20,42	19,61
Lisina digestível, %	1,50	1,35	1,23
Metionina digestível, %	0,53	0,47	0,42
Metionina + Cistina digestível, %	0,82	0,74	0,68
Treonina digestível, %	0,88	0,79	0,73
Valina digestível, %	0,95	0,86	0,78
Triptofano digestível, %	0,25	0,22	0,21
Ca Total, %	0,85	0,80	0,70
P disponível, %	0,45	0,40	0,33

¹Fornecendo por kg da dieta: cobalto, 1 mg; cobre, 13 mg; ferro, 100 mg; iodo, 1,0 mg; manganês, 50 mg e zinco, 95 mg.

²Fornecendo por kg da dieta: vitamina A, 9000 UI; vitamina D3, 2000 UI; vitamina E, 54 UI; vitamina K3, 4 mg; ácido fólico, 0,45 mg; ácido pantotênico, 21 mg; biotina, 0,16 mg; cianocobalamina, 30 μ g; niacina, 40 mg; piridoxina, 2,9 mg; riboflavina, 5 mg; selênio, 0,40 mg e tiamina, 1,8 mg.

3.2.2. Procedimentos experimentais

Os animais foram submetidos a um desafio sanitário (adaptado de Kahindi et al., 2014), que consistiu na aspersão de 575 mL de uma mistura de água e fezes suína (1 kg de fezes frescas para cada 5L de água) em cada baia, um dia antes do início do experimento. Além disso, as baias não foram lavadas antes e durante a primeira fase do experimento.

A presença de diarreia (fezes líquidas) ou sua ausência (fezes normais) foi avaliada por meio de observação visual de sinais de diarreia em cada animal. Diariamente, quantificou-se o número de animais com presença e ausência de diarreia em cada baia. Para cada baia, fez-se a média do número de observações indicando a presença de diarreia em relação ao número de animais na baia. A partir deste número, calculou-se a percentagem de dias com diarreia no período experimental de acordo com Milani et al. (2017):

$$DO (\%) = \{[(P1 \times D) + (P2 \times D) + (Pn \times D)] / n / TD\} \times 100,$$

Em que: DO (%) é a percentagem média de dias que os leitões apresentaram diarreia em cada baia; P(1, 2...n) representa cada leitão dentro da baia (n), D é o número de dias em que cada leitão apresentou diarreia dentro da baia, TD é o número de dias de cada fase do programa nutricional utilizado.

Os animais, a ração fornecida e as sobras de ração nos comedouros foram pesados semanalmente, para determinação do ganho diário de peso (GDP) e do consumo diário de ração (CDR) e cálculo da conversão alimentar (CDR/GDP) por baia. Toda a ração desperdiçada pelos animais para fora dos comedouros foi recolhida, pesada e descontada do total fornecido aos animais.

Amostras de sangue (7 mL) foram coletadas assepticamente da veia jugular de 1 leitão por baia, cujo peso foi o mais próximo ao peso médio da baia, no final das fases 1 e 2 (dias 7 e 21 de experimento, respectivamente). O sangue foi coletado em tubos de vacutainers (BD, Franklin Lakes, NJ) contendo EDTA. As amostras de plasma foram separadas por centrifugação a 4,000 rpm a 4 ° C por 15 min e congeladas a -80 ° C para análise do perfil hematológico, IgA, IgG e IgM. As séries hematimétricas e leucométricas globais foram obtidas usando um contador automático de células veterinárias, MC-6200 Vet (Shenzhen Maxcom Electronic, China), e confirmação da leucometria específica realizada pela técnica de esfregaço de sangue por coloração diferencial pelo método panótico, de acordo com Dacie e Lewis (1995). A fórmula absoluta de leucócitos foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias. Para determinação das concentrações de imunoglobulinas as análises foram

realizadas no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal (LAFA, ESALQ/USP), as concentrações foram determinadas pela técnica de imunodifusão radial (Mancini et al., 1965; Besser et al., 1985), que relaciona o diâmetro do anel de precipitação formado pela reação da Ig na amostra com o anti-soro Ig presente no ágar. Os diâmetros das amostras foram comparados com os diâmetros de padrões previamente estabelecidos. O ágar foi preparado com anti-soro IgG, IgM ou IgA porcino (Sigma Chemicals Company, EUA) e para curvas padrão foram utilizados, respectivamente, IgG, IgM ou IgA porcino (Sigma Chemicals Company, EUA).

Após a coleta de sangue realizada no sétimo dia do experimento, efetuou-se eutanásia do animal que teve sangue coletado, para amostragem do tecido intestinal. Os animais sacrificados passaram por jejum de oito horas, foram insensibilizados por eletronarcole (1,3 A por 3 segundos, 240 V) e em seguida eutanasiados por sangria, e o trato gastrointestinal foi rapidamente removido e identificado. Na porção proximal do duodeno e jejuno de cada leitão foram coletadas cortes de 7 cm. Cada seção foi suavemente lavada e submersa em uma solução tampão de formaldeído-fosfato a 10% em um recipiente identificado individualmente para posterior avaliação morfológica microscópica. As porções distal do duodeno e do jejuno também foram extraídas para coleta de 1,5 mL de amostras de mucosa, que foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido por duas horas e transferidas para o freezer a -80°C para quantificação de IgA.

As seções de 7 cm de duodeno e jejuno foram lavadas com solução salina (0,85% de NaCl), fixadas em solução de formol tamponado neutro a 10%. As amostras foram embebidas em parafina, de seção delgada e fixadas em lâminas de microscópio com coloração com hematoxilina e eosina (AFIP, 1994). As lâminas foram avaliadas sob uma câmera de vídeo Sony CCD acoplada a um microscópio (Belkin e Stepp, 2000) com ampliação de 10x. Uma média de 15 altura das vilosidades, largura das vilosidades e profundidade das criptas foi medida em cada lâmina,

3.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os animais foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados, de acordo com o peso inicial, com 5 tratamentos e 10 repetições por tratamento, sendo a baía, com 5 animais (três machos castrados e duas fêmeas) na semana 1 e quatro animais nas demais semanas, considerada a unidade experimental. Os dados foram analisados usando o procedimento PROC MIXED do SAS (versão 9,2; SAS Inst, Inc., Cary, NC) com dieta como efeito fixo e blocos como efeito aleatório. A normalidade dos erros foi testada pelo método

Cramer-von Misses, e os dados foram analisados quanto a valores discrepantes, que foram removidos quando necessário e os valores de reposição estimados. Os resultados de frequência de diarreia foram transformados ($y = \arcseno \sqrt{p/100}$). Todos os dados foram submetidos à ANOVA e as comparações médias foram realizadas pelo teste de Tukey (5%) e foi considerada tendência quando $0,06 > P < 0,10$. Os dados de desempenho e frequência de diarreia foram analisados como medidas repetidas usando dados semanais da baía com a estrutura de variância-covariância de dependência anterior de primeira ordem, com base nas estatísticas de ajuste do critério de informação bayesiano (BIC).

3.3. Resultados

Não foram verificadas diferenças no GDP, CDR, CA (Tabela 2) e na frequência de diarreia (Tabela 3) entre leitões alimentados com as diferentes dietas experimentais. Os animais que receberam a dieta BG100 apresentaram tendência de ($P = 0,0624$) de maior GPD (264,1 vs, 213,4) quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle na semana 2 (dias 8 a 14) do experimento.

Ao analisar a morfometria intestinal, não houve diferença na altura das vilosidades, profundidade da cripta, área das vilosidades no jejuno entre leitões alimentados com diferentes dietas experimentais (Tabela 4), porém os leitões que receberam a dieta Halq apresentaram maior profundidade de cripta ($P = 0,017$) no duodeno em comparação aos animais que receberam a dieta MOS e, ambos os grupos não diferiram ($P > 0,05$) dos demais tratamentos.

Não foram observadas diferenças na contagem total de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração média de hemoglobina corpuscular e número total de plaquetas no soro dos leitões que receberam as diferentes dietas experimentais (Tabela 5) e na contagem total de glóbulos brancos, monócitos, neutrófilos e linfócitos no soro dos leitões ao 7º e 21º de experimento (Tabela 6).

Em contrapartida, os leitões alimentados com dieta BG50 apresentaram concentração de neutrófilos 20% maior ($P < 0,05$) em comparação aos animais alimentados com a dieta controle no dia 21. Além disso, a inclusão de MOS nas dietas aumentou ($P < 0,05$) a concentração de linfócitos em 22% no soro sanguíneo dos leitões, em comparação aos animais alimentados com dieta BG50.

Tabela 2: Peso corporal, ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) dos leitões alimentados com as dietas experimentais durante todo o período experimental (1 a 42 dias)^a

Itens	Dietas					SEM ^b	P valor
	CONT	BG 50	BG 100	MOS	HALQ		
Peso corporal (kg)							
Dia 1	6,49	6,48	6,48	6,49	6,49	0,05	-
Dia 7	7,58	7,37	7,45	7,48	7,43	0,28	0,472
Dia 14	9,18	9,04	9,37	9,32	9,19	0,28	0,599
Dia 21	11,51	10,97	11,82	11,62	11,57	0,30	0,357
Dia 28	14,09	13,58	14,35	14,44	14,35	0,34	0,690
Dia 35	17,54	16,88	17,56	17,84	17,98	0,39	0,778
Dia 42 ^c	21,18	20,14	21,32	21,68	21,51	0,45	0,686
GPD (g/d)							
Dia 1–7	189.2	150.7	183.8	166.1	157.8	9.8	0.143
Dia 8–14	213.4	217.1	264.1	247.0	244.7	10.2	0.062
Dia 15–21	324.1	288.7	349.8	336.5	340.3	13.0	0.394
Dia 22–28	368.1	360.2	380.2	403.1	406.6	13.1	0.516
Dia 29–35	492.1	462.0	482.9	485.3	518.5	14.8	0.703
Dia 36–42 ^c	501.2	452.1	537.9	549.5	540.7	19.1	0.432
Dia 1–42	349.0	325.0	353.3	362.0	357.0	8.4	0.139
CDR (g/d)							
Dia 1–7	285.9	273.9	269.5	274.0	267.1	14.8	0.803
Dia 8–14	350.4	338.9	372.8	359.7	363.3	15.6	0.622
Dia 15–21	536.6	498.6	567.6	538.2	557.5	17.2	0.268
Dia 22–28	652.9	612.6	651.9	693.9	700.0	22.5	0.527
Dia 29–35	899.6	854.8	899.2	902.3	905.7	21.7	0.862
Dia 36–42 ^c	1089.3	973.3	1072.8	1100.4	1053.7	27.6	0.472
Dia 1–42	637.0	594.0	642.0	646.0	644.0	13.3	0.154
CA (CDR/GDP)							
Dia 1–7	1,53	1,69	1,51	1,68	1,74	0,05	0,400
Dia 8–14	1,67	1,62	1,42	1,49	1,50	0,04	0,208
Dia 15–21	1,70	1,81	1,67	1,61	1,69	0,03	0,349
Dia 22–28	1,77	1,74	1,76	1,74	1,76	0,04	0,999
Dia 29–35	1,85	1,89	1,89	1,89	1,75	0,03	0,496
Dia 36–42 ^c	2,31	2,27	1,97	2,01	2,16	0,06	0,316
Dia 1–42	1,84	1,84	1,83	1,79	1,81	0,01	0,847

CONT = dieta controle, sem antimicrobiano; BG50: CONT + 50 mg de β -glucanos/t ração; BG100: CONT + 100 mg de β -glucanos/t ração; MOS: CONT + 500 mg de manoligossacarídeo solúvel/ t ração; HALQ: CONT + 120 ppm do antibiótico Halquinol.

^a Os valores são LSMEANS baseados em 10 observações, 5 leitões por baía na semana 1 e 4 leitões por baía nas semanas restantes.

^b EPM = erro padrão da média.

^c Os dados de desempenho foram analisados usando medidas repetidas por 6 semanas.

Tabela 3: Frequência de diarreia dos leitões alimentados com as dietas experimentais durante todo o período experimental (1 a 42 dias)^a

Items ^b	Dietas					SEM ^b	P valor
	CONT	BG 50	BG 100	MOS	HALQ		
Frequência de diarreia ^c , %							
1 a 7 d	36,14	37,85	33,95	38,42	38,16	5,3	0,972
7 a 14 d	43,71	41,21	36,66	38,71	34,92	6,7	0,881
14 a 21 d	16,59	15,35	13,57	12,78	15,71	4,6	0,943
21 a 28 d	8,45	11,32	15,47	9,52	11,72	3,6	0,894
28 a 35 d	9,99	6,90	12,61	7,50	6,42	3,7	0,492
35 a 42 d	24,02	17,77	17,5	14,58	11,66	5,3	0,755
1 a 42 d	23,15	21,74	21,63	20,25	19,77	3,1	0,859

CONT = dieta controle, sem antimicrobiano; BG50: CONT + 50 mg de β -glucanos/t ração; BG100: CONT + 100 mg de β -glucanos/t ração; MOS: CONT + 500 mg de manoligossacarídeo solúvel/ t ração; HALQ: CONT + 120 ppm do antibiótico Halquinol.

^a Os valores são LSMEANS baseados em 10 observações, 5 leitões por baia na semana 1 e 4 leitões por baia nas semanas restantes.

^b EPM = erro padrão da média.

^c Os dados de frequência de diarreia foram analisados usando medidas repetidas durante 6 semanas.

Tabela 4: Altura média das vilosidades (AV), profundidade da cripta (PC), razão AV / PC e área no duodeno e jejuno dos leitões ao 7º dia experimento, alimentados com as dietas experimentais^a

Item	Dietas					EPM ^b	P valor
	CONT	BG50	BG100	MOS	HALQ		
Duodeno							
AV, μm	426,66	432,19	434,28	412,27	455,80	7,781	0,4095
PC, μm	188,01 ^{ab}	196,87 ^{ab}	185,65 ^{ab}	178,77 ^b	205,78 ^a	3,177	0,0172
AV/PC	2,27	2,20	2,35	2,32	2,23	0,034	0,5425
Área, μm^2	1,73	1,70	1,70	1,62	1,92	0,053	0,3449
Jejuno							
AV, μm	364,39	381,90	373,92	368,45	383,55	7,139	0,8772
PC, μm	154,01	156,35	146,80	149,28	155,58	2,986	0,8155
AV/PC	2,40	2,48	2,56	2,50	2,48	0,053	0,9172
Área, μm^2	1,26	1,37	1,34	1,20	1,29	0,038	0,6231

CONT = dieta controle, sem antimicrobiano; BG50: CONT + 50 mg de β -glucanos/t ração; BG100: CONT + 100 mg de β -glucanos/t ração; MOS: CONT + 500 mg de manoligossacarídeo solúvel/ t ração; HALQ: CONT + 120 ppm do antibiótico Halquinol.

^a Os valores são LSMEANS com base em 10 observações por dieta no dia 7.

^b EPM = Erro Padrão da Média.

Tabela 5: Eritrograma e plaquetas dos leitões ao 7º e 21º dias de experimento, alimentados com as dietas experimentais^a

Itens	Dietas					EPM ^b	P valor
	CONT	BG50	BG100	MOS	HALQ		
Dia 7							
Hemácias, 10 ⁶ /μL	6,77	6,49	6,40	6,88	6,50	0,09	0,338
Hemoglobina, g/dL	11,32	10,93	10,70	11,76	10,91	0,17	0,217
Hematócrito, %	40,93	39,15	38,54	41,19	38,96	0,55	0,316
VCM ^c , fL	60,47	60,47	60,27	59,92	60,06	0,40	0,988
CHCM ^c , %	27,64	27,87	27,73	28,12	27,99	0,12	0,652
Plaquetas, 10 ³ /μL	638,16	652,36	601,84	637,28	506,40	31,4	0,544
Dia 21							
Hemácias, 10 ⁶ /μL	6,35	6,57	6,27	6,68	6,18	0,10	0,389
Hemoglobina, g/dL	10,84	11,34	10,89	11,44	10,69	0,17	0,465
Hematócrito, %	38,14	40,23	38,43	40,47	37,97	0,58	0,420
VCM ^c , fL	60,16	61,37	61,26	60,61	61,61	0,35	0,616
CHCM ^c , %	28,46	28,19	28,37	28,25	28,14	0,09	0,742
Plaquetas, 10 ³ /μL	604,60	617,94	512,85	650,56	591,15	22,77	0,355

CONT = dieta controle, sem antimicrobiano; BG50: CONT + 50 mg de β-glucanos/t ração; BG100: CONT + 100 mg de β-glucanos/t ração; MOS: CONT + 500 mg de manoligossacarídeo solúvel/ t ração; HALQ: CONT + 120 ppm do antibiótico Halquinol.

^a Os valores são LSMEANS com base em 10 observações por dieta nos dias 7 e 21.

^b EPM = Erro Padrão da Média.

^c VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração da hemoglobina corpuscular média.

Tabela 6: Leucograma dos leitões ao 7º e 21º dias de experimento, alimentados com as dietas experimentais^a

Items ^b	Dietas					EPM ^c	P valor
	CONT	BG50	BG100	MOS	HALQ		
Dia 7							
CBS, 10 ³ /μL	25,18	21,04	25,00	20,08	20,36	0,964	0,161
Neutrófilos							
%	47,95	41,13	49,52	46,70	46,77	1,524	0,090
10 ³ /μL	11,83	9,06	12,58	10,02	9,41	0,584	0,261
Linfócitos,							
%	49,02	56,32	47,45	50,19	50,32	1,490	0,081
10 ³ /μL	11,95	12,00	11,69	10,25	10,37	0,540	0,714
Monócitos,							
%	2,12	1,98	2,5	2,69	2,37	0,211	0,878
10 ³ /μL	0,528	0,365	0,649	0,549	0,498	0,052	0,586
Dia 21							
CBS, 10 ³ /μL	21,45	18,19	20,19	18,48	19,54	0,788	0,742
Neutrófilos,							
%	44,04 ^a	53,07 ^b	51,44 ^{ab}	48,25 ^{ab}	52,12 ^{ab}	1,789	0,040
10 ³ /μL	9,376	9,996	10,304	9,343	10,143	0,503	0,963
Linfócitos,							
%	46,52 ^{ab}	38,75 ^b	39,69 ^{ab}	47,37 ^a	44,02 ^{ab}	1,868	0,0133
10 ³ /μL	11,95	12,00	11,69	10,25	10,37	0,503	0,714
Monócitos,							
%	2,55	2,70	2,35	2,48	1,90	0,233	0,818
10 ³ /μL	0,495	0,472	0,464	0,477	0,380	0,044	0,937

CONT = dieta controle, sem antimicrobiano; BG50: CONT + 50 mg de β-glucanos/t ração; BG100: CONT + 100 mg de β-glucanos/t ração; MOS: CONT + 500 mg de manoligossacarídeo solúvel/ t ração; HALQ: CONT + 120 ppm do antibiótico Halquinol.

^a Os valores são LSMEANS com base em 10 observações nos dias 7 e 21.

^b CBS, total células brancas do sangue; NEU, neutrófilos; LINF, linfócitos; MON, monócitos.

^c EPM = Erro Padrão da Média.

Em relação à concentração de imunoglobulinas no 7º dia de experimento, os animais alimentados com a dieta controle apresentaram IgA sérico duas vezes maior ($P < 0,05$) em comparação ao grupo alimentado com a dieta BG100, porém não foram observadas diferenças para IgA da mucosa, IgG e IgM séricos ($P > 0,05$) (Tabela 7). Para o 21º dia de experimento, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas. Embora não estatisticamente diferentes, os leitões que receberam as dietas BG50, BG100, MOS e HALQ apresentaram concentração de IgA na mucosa intestinal de 2,1 a 2,7 vezes maior ($P > 0,05$) em comparação aos animais submetidos à dieta controle.

Tabela 7: Conteúdo de imunoglobulinas A, G e M no soro sanguíneo (mg / mL) e conteúdo de imunoglobulina A na mucosa do jejuno (mg / g de proteína total) dos leitões ao 7º e 21º dias de experimento, alimentados com as dietas experimentais^a

Items ^b	Dietas					EPM ^c	P valor
	CONT	BG50	BG100	MOS	HALQ		
Dia 7							
IgA							
Soro	5,95 ^a	3,67 ^{ab}	2,91 ^b	3,52 ^{ab}	5,07 ^{ab}	0,16	0,026
Mucosa	0,964	2,264	2,563	2,450	2,034	0,144	0,348
IgG	15,03	14,01	12,70	13,05	15,73	0,14	0,716
IgM	1,115	1,094	1,081	1,044	1,042	0,151	0,499
Dia 21							
IgA	0,414	0,358	0,357	0,367	0,302	0,188	0,718
IgG	17,84	15,98	17,18	18,81	19,34	0,14	0,630
IgM	1,321	1,436	1,383	1,373	1,439	0,145	0,187

CONT = dieta controle, sem antimicrobiano; BG50: CONT + 50 mg de β -glucanos/t ração; BG100: CONT + 100 mg de β -glucanos/t ração; MOS: CONT + 500 mg de manoligossacarídeo solúvel/ t ração; HALQ: CONT + 120 ppm do antibiótico Halquinol.

^a Os valores são LSMEANS com base em 10 observações nos dias 7 e 21.

^b Imunoglobulinas A, G e M no soro e mucosa do jejuno.

^c EPM = Erro Padrão da Média.

3.4. Discussão

O presente estudo avaliou o efeito da suplementação de β -(1,3-1,6) glucanos e MOS em substituição à antibiótico promotor de crescimento em leitões recém-desmamados sob desafio sanitário. A exposição dos leitões a ambiente com más condições sanitárias, foi implementada de modo a criar situação em que a utilização de aditivos antimicrobianos e de seus possíveis substitutos fosse necessária para permitir bom desempenho dos animais e, conseqüentemente, possibilitasse visualização dos potenciais efeitos dos aditivos testados.

Em estudos comparando-se o desempenho zootécnico de suínos alimentados com e sem β -glucano em ambientes com diferentes condições higiênicas, verificou-se melhor ganho de peso dos leitões alimentados com β -glucano em relação aos animais controle apenas na condição de alojamento em estado higiênico ruim, ao passo que nenhum benefício relacionado ao prebiótico foi detectado em leitões expostos à menores cargas patogênicas (Decuypere et al., 1998; Hiss & Sauerwein, 2003). Similarmente ao nosso estudo, Hahn et al, (2006) observaram tendência linear ($P = 0,086$ e $P=0,068$) para GDP em leitões recém desmamados durante as fases II (3 a 5 semanas após o desmame) e no estudo total, respectivamente. Os autores atribuíram a tendência linear para GDP ao aumento linear na digestibilidade dos nutrientes,

Outra possível justificativa para a ausência de efeitos dos aditivos prebióticos sobre as variáveis desempenho, pode ter sido as dosagens dos beta-glucano utilizadas. Zhou et al (2013) não encontraram diferenças nas variáveis de desempenho com a inclusão de 0,1 g/kg de β -glucano na dieta, similar ao tratamento BG100 do presente estudo. Em contrapartida, Dritz et al, (1995) constataram que a suplementação com 0,25 g de β -glucano / kg de dieta aumentou o GDP e o CDR em leitões recém-desmamados.

A avaliação da morfologia intestinal dos leitões buscou identificar efeitos dos oligossacarídeos testados sobre o estado funcional do intestino delgado, que é caracterizado, em parte, pela altura das vilosidades e profundidade da cripta. Os resultados da presente pesquisa foram similares aos encontrados por Van der Peet-Schwering, et al. (2007), que não verificaram efeitos dos tratamentos dietéticos de cultura de levedura (0,125% de YC) e cultura de levedura modificada (0,125% YC + 0,2% produto da parede celular (CWP) contendo MOS) em suínos na altura das vilosidades, na profundidade da cripta ou na relação altura de vilosidade : profundidade de cripta. Em contrapartida, Shen et al. (2014) observaram aumento na altura de vilosidades de leitões desmamados que receberam 2,5, 5 e 10 g/kg de cultura de levedura fermentada, concentrações maiores das que as utilizadas no presente estudo. Sendo assim, a baixa dosagem de beta-glucano e MOS no presente estudo pode explicar, em parte, a ausência de resultados sobre a morfologia do epitélio intestinal,

Os parâmetros hematológicos encontrados estão dentro do padrão fisiológico para a espécie suína (Miller et al., 1961; Feldman et al., 2000; Tizard et al., 2002; Saleh et al., 2015), verificando-se diferença entre os tratamentos sobre os neutrófilos e linfócitos aos 21 dias do período experimental.

Os linfócitos desempenham papel fundamental na defesa do organismo, pois são as células que reconhecem e respondem a antígenos estranhos, constituindo, assim, os mediadores da imunidade humoral e celular (Abbas et al., 2015). Estudos tem reportado que a inclusão de MOS na dieta promove melhorias na resposta imune (Halas e Nochta, 2012). Davis et al. (2004) constataram um aumento de 18,45% na proliferação de linfócitos em animais que receberam 2 g de mananos/kg de ração em comparação ao grupo controle, ressaltando, assim, que a maior proporção de linfócitos no sangue observada quando os leitões foram alimentados com mananos pode ser uma indicação de que esta suplementação alivia as alterações na função imunológica que resultam em uma resposta inflamatória durante o estresse do desmame.

Os neutrófilos, também denominados de leucócitos polimorfonucleares, constituem a população mais abundante de células brancas sanguíneas circulantes e medeiam as fases iniciais das reações inflamatórias (Abbas et al., 2015). Segundo Sonck et al, (2010) e Rubin-Bejerano et al. (2007), os β -glucanos possuem a capacidade de estimular neutrófilos e monócitos pela produção de espécies reativas de oxigênio. Os resultados do presente estudo estão de acordo com Sonck et al. (2010) que avaliaram os efeitos dos β -glucanos em estudo *in vitro*, constataram que duas fontes de β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae* e Macrogard) parecem ter um efeito de estimular o sistema imune pois, além da proliferação de linfócitos, estimulam também neutrófilos e monócitos e dão origem à produção de TNF- α e IL-1 β , duas citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os autores ressaltam que, para altas concentrações, ambos os β -glucanos não estimulam a proliferação de linfócitos e neutrófilos e, apresentam um efeito citotóxico.

A IgA é o anticorpo mais abundante nas secreções da mucosa intestinal (Cerutti et al., 2011; Corthesy, 2013). No intestino, a IgA monomérica interage com um pequeno polipeptídeo derivado de células plasmáticas denominado cadeia de junção para formar dímeros de IgA que reconhecem o receptor de imunoglobulina polimérica (pIgR) na superfície basolateral das células do epitélio intestinal (Brandtzaeg, 1974; Mostov e Deitcher, 1986; Mestecky e McGhee, 1987).

A produção dos vários tipos de imunoglobulinas pode ser afetada pelos glucanos (Sauerwein et al, 2007). Esses autores ao avaliarem a inclusão de 300g/ton de ração de extrato de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* concluíram que doses mais baixas favorecem a

concentração de IgA. Tal fato, foi constatado no presente estudo, em que os níveis séricos dos leitões que receberam a dieta BG50 apresentaram maior concentração de IgA em comparação aos animais do grupo BG100.

Também há relatos demonstrando efeitos estimuladores dos MOS sobre a IgA. Segundo Halas e Nochta (2012), a maior produção de IgA na mucosa é provavelmente atribuível à ativação da defesa imunológica local através dos receptores de ligação à manose localizados na superfície intestinal. De fato, observou-se, no presente estudo, aumento numérico, mas não estatístico, na concentração de IgA na mucosa intestinal de leitões alimentados com as dietas contendo prebióticos em comparação ao grupo controle.

O ambiente em que os leitões foram mantidos podem explicar a ausência de efeitos dos produtos testados sobre as variáveis analisadas. Segundo Hiss & Sauerwein (2003) diferentes cargas de patogênicas presentes nos sistemas de instalação podem ter efeitos sobre a resposta do animal ao β -glucano. Para avaliar o potencial efeito imunomodulador do β -1,3-1,6-glucano Decuyper et al. (1998) compararam o desempenho de suínos alimentados com β -glucano vs controle mantidos em dois ambientes com diferentes condições higiênicas. Os autores observaram que, apenas os leitões da granja com um estado higiênico inferior responderam com aumento do ganho diário de peso, ao passo que nenhum benefício relacionado ao β -glucano na taxa de crescimento foi detectado em leitões expostos à menores cargas patogênicas.

Diante do exposto, os níveis de β -glucano, MOS, bem como o antibiótico halquinol, não foram eficientes em promover melhorias no desempenho, reduzir a incidência de diarreia e estimular a resposta imune de leitões pós-desmame. Entretanto, vale ressaltar que, a tendência ($P = 0,06$) para um GPD maior de animais que receberam a dieta BG100 em comparação aos animais alimentados com a dieta controle na segunda semana do experimento, o aumento numérico de IgA na mucosa intestinal de leitões alimentados com dietas teste em comparação aos animais da dieta controle e a maior ($P < 0,05$) porcentagem de neutrófilos no soro sanguíneo do grupo BG50, em comparação ao grupo controle, são indicativos do potencial do β -glucano em melhorar o status imunológico e o desempenho de leitões pós-desmame. São necessários mais estudos, testando diferentes desafios sanitários para leitões na fase de creche e, além disso, diferentes concentrações de β -glucano nas dietas, a fim de elucidar o efeito do aditivo na alimentação de leitões.

Referências

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S, 2015. Imunidade Regional: Respostas imunes especializadas em tecidos epiteliais e imunoprivilegiados. *Imunologia celular e molecular*, 8, ed, Rio de Janeiro: Elsevier.
- ANJOS CM, GOIS FD, ANJOS CM, ROCHA VS, CASTRO DE, ALLAMAN IB, SILVA FL, CARVALHO PLO, MENEGHETTI C, COSTA LB, 2019. Effects of dietary beta-glucans, glucomannans and mannan oligosaccharides or chlorohydroxyquinoline on the performance, diarrhea, hematological parameters, organ weight and intestinal health of weanling pigs. *Liv Sci*, 223, 39-46.
- BELKIN AM, STEPP MA, 2000. Integrins as Receptors for Laminins. *Microscopy research and technique* 51, 280-301.
- BESSER TE, GARMEDIA AE, McGUIRE, TC, GAY CC, 1985. Effect of colostral immunoglobulin G1 and immunoglobulin M concentration on immunoglobulin absorption in calves. *J Dairy Science*, 68, 2033-2037.
- BRANDTZAEG P, 1974. Presence of J chain in human immunocytes containing various immunoglobulin classes. *Nat* 252:418– 420.
- BRANDTZAEG P, PRYDZ H, 1984. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nat* 311:71–73.
- CAMPBELL JM, CRENSHAW JD, POLO J, 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol* 4 (1): 19.
- CERUTTI A, CHEN K, CHORNY A, 2011. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Ver Immunol* 29:273–293.
- CORTHESEY B, 2013. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol* 4:185.
- CROMWELL GL, 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim Biotech* 13; 7–27.
- CROTTET P, CORTHESEY B, 1998. Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')₂: a possible implication for mucosal defense. *J Immunol* 161:5445–5453.
- DACIE JD, LEWIS SM, 1995. *Practical Hematology*, Churchill Livingstone, Edinburgh,
- DAVIS ME, MAXWELL CV, ERF GF, WISTUBA TJ, 2004, Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J Anim Sci* 82 (6): 1882-1891,

- DECUYPERE N, DIERICK N, BODDEZ S, 1998. The potentials for immunostimulatory substances (α -1,3/1,6 glucans) in pig nutrition. *J Anim Feed Sci* 7, 259.
- DE VRESE M, SCHREZENMEIR J, 2008. Prebiotics, Em: Stahl U, Donalies U,E., Nevoigt E, (eds) Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Berlin, Heidelberg: Springer; 33 – 45.
- DRITZ SS, SHI J, KIELIAN TL, GOODBAND RD, NELSSSEN JL, TOKACH MD, CHENGAPPA MM, SMITH JE, BLECHA F, 1995. Influence of dietary beta-glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to streptococcus suis infection in weanling pigs. *J Anim Sci* 73, 3341.
- FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC, 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- GAGGIÀ F, MATTARELLI P, BIAVATI B, 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 141, 15–28.
- GIBSON GR, SCOTT KP, RASTALL RA, TUOHY KM, HOTCHKISS A, DUBERT-FERRANDON A, GAREAU M, MURPHY EF, SAULNIER D, LOH G, et al., 2010. Dietary prebiotics: Current status and new definition, *Food Sci and Tech Bulletin: Func Foods* 7 (1): 1 – 19.
- HALAS V, NOCHTA I, 2012. Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals* 23 (2):261–74.
- HAHN TW, LOHAKARE JD, LEE SL, MOON WK, CHAE BJ, 2006. Effects of supplementation of β -glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. *J Anim Sci* 84:1422–1428.
- HISS S, SAUERWEIN H, 2003. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *Anim Physiol Anim* 87, 2–11.
- KUDOH K, SHIMIZU J, ISHIYAMA A, WADA M, TAKITA T, KANKE Y, INNAMI S, 1999. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *J Nut Sci Vitaminol* 45 (2): 173-81.
- LE FLOCH N, LE BELLEGO L, MATTE JJ, MELCHIOR D AND SEVE B, 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *J Anim Sci* 87(5); 1686–1694.
- LI J, LI DF, XING JJ, CHENG ZB, LAI H, 2006. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Anim Sci* 84, 2374–2381.

- LI P, PIAO X, RU Y, HAN X, XUE L, ZHANG H, 2012. Effects of Adding Essential Oil to the Diet of Weaned Pigs on Performance, Nutrient Utilization, Immune Response and Intestinal Health. *Asian-Aust J Anim Sci* 25 (11): 1617-1626.
- LONG SF, XUA YT, PANA L, WANGA QQ, WANGA CL, WUA JY, WUB YY, HANB YM, YUNC CH, PIAOA XS, 2018, Mixed organic acids as antibiotic substitutes improve performance, serum immunity, intestinal morphology and microbiota for weaned piglets. *Anim Feed Sci and Tech*, (235): 23–32.
- LU X, ZHANG M, ZHAO L, GE K, WANG Z, JUN L, REN F, 2018. Growth performance and post-weaning diarrhea in piglets fed a diet supplemented with probiotic complexes. *J Microbiol Biotechnol* 28(11), 1791–1799.
- MACFARLANE GT, CUMMINGS JH, 1991. The colonic flora, fermentation and large bovel digestive function. Em: PHILLIPS, SF,, PEMBERTON, J,H,, SHORTER, R,G, (Eds.), *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*, Nova York: Raven Press, 51–94.
- MANCINI G, CARBONARA AO, HERMANS JF, 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunoc* 2, 253-254.
- MESTECKY J, MCGHEE JR, 1987, Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and imune response. *Adv Immunol* 40:153–245,
- MILLER ER, ULREY DE, ACKERMANN I, SCHMIDT DA, LUECKE RW, HOEFER, JA, 1961. Swine hematology from birth to maturity, II, Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *J Anim Sci*, 20, 890-897.
- MOSTOV KE, DEITCHER DL, 1986. Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA. *Cell* 46:613–621.
- NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2012. *Nutrient Requirements of Swine*, 11th,ed, Washington: NRC, 400p.
- O’CARRA R, 1997, An assessment of the potential of mannan oligosaccharides as immunostimulants. MsC, Thesis, National University of Ireland, Galway, Ireland.
- PASTORELLI H, LE FLOC’H N, MERLOT E, MEUNIER-SALAÜN MC, VAN MILGEN J, MONTAGNE L, 2012. Sanitary housing conditions modify the performance and behavioural response of weaned pigs to feed- and housing-related stressors. *Anim* 6 (11); 1811-1820.
- PHALIPON A, CARDONA A, KRAEHENBUHL JP, EDELMAN L, SANSONETTI PJ, CORTHESEY B, 2012. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immun*17:107–115.

- PRETTUS HA, ENSLEY HE, MCNAMEE RB, JONES EL, BROWDER IW, WILLIAMS DL, 1991. Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. *J Pharmacol Exp Ther* 257, 500-510.
- ROBERTSEN B, 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol* 9 (4): 269.
- RUBIN-BEJERANO I, ABEIJON C, MAGNELLI P, GRISAFI P, FINK GR, 2007. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* 2, 55–67.
- SALEH MAD, AMORIM AB, GRECCO HAT, BERTO DA, PADOVANI CR, ORSI RO, TSE MLP, 2015. Effects of $\beta(1\rightarrow3,1\rightarrow6)$ -D-glucan and density of diets on the blood profiles of immunologically challenged weaned piglets. *Int J Bio Micro* ,80, 659-667.
- SAN ANDRES JV, MASTROMANO GA, LI Y, TRAN H, BUNDY JW, MILLER PS, BURKEY TE, 2019. The effects of prebiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs. *Transl Anim Sci*, 3, 1315–1325.
- SAUERWEIN H, SCHMITZ S, HISS, 2007. Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. *J Anim Phys Anim Nutr* 91, 369–380.
- SHEN YB, PIAO XS, KIM SW, WANG L, LIU P, YOON I, ZHEN YG, 2014. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J Anim Sci* 87:2614–262.
- SONCK E, STUYVEN E, GODDEERIS B, COX E, 2010, The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 15;135(3-4):199-207.
- SPRING P, 1999 Mannan-oligosaccharides as an alternative to antibiotic use in Europe. *Zoot Int* 22, 38–41.
- STRUGNELL RA, WIJBURG OL, 2010, The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Ver Microbiol* 8:656–667.
- SWANSON KS, GRIESHOP CM, FLICKINGER EA, BAUER, LL, HEALY HP, DAWSON KA, MERCHEN NR, FAHEY GC, 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr* 132 (5): 980-989.
- TIZARD IR, 2014. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*, Elsevier: São Paulo.

- VALENZUELA-GRIJALVA NV, PINELLI-SAAVEDRA A, MUHLIA-ALMAZAN A, DOMÍNGUEZ-DÍAZ D, GONZÁLEZ-RÍOS H, 2017. Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production, *J Anim Sci Technol* 59(1):8.
- VAN DER PEET-SCHWERING CMC, JANSMAN AJM, SMIDT H, YOON, 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs *J Anim Sci* 85(11):3099-3109.
- VETVICKA V, OLIVEIRA C, 2014. $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glucans modulate immune status in pigs: potential importance for efficiency of commercial farming. *Ann Transl Med* 2(2):16.
- YANG F, HOU C, ZENG X, QIAO S, 2015. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets, *Pathogens* 4 (1): 34-45.
- WANG Z, GUO Y, YUAN J, ZHANG B, Effect of Dietary β -1,3/1,6-glucan Supplementation on Growth Performance, 2008. Immune Response and Plasma Prostaglandin E2, Growth Hormone and Ghrelin in Weanling Piglets, *Asian-Aust J Anim Sci* 21 (5) : 707 – 714.
- WANG MQ, DU YJ, WANG C, TAO WJ, HE YD, LI H, 2012. Effects of Copper-Loaded Chitosan Nanoparticles on Intestinal Microflora and Morphology in Weaned Piglets, *Biol Trace Elem Res* 149(2):184-189.
- ZHOU TX, JUNG JH, ZHANG ZF, KIM IH, 2013. Effect of dietary β -glucan on growth performance, fecal microbial shedding and immunological responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs, *Anim Feed Sci Tech* (179) : 85-92.
- ZUO J, LING B, LONG L, LI T, LAHAYE L, YANG C, FENG D, 2015. Effect of dietary supplementation with protease on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets, *Anim Nutr* (4) : 276-282.

4. UTILIZAÇÃO DE EXTRATO PIROLENHOSO EM SUBSTITUIÇÃO AO USO DE ANTIBIÓTICOS E SEUS EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES PÓS-DESMAME

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inclusão do extrato pirolenhoso (EP), em substituição aos antibióticos como promotores de crescimento (APC) em dietas para leitões recém desmamados, dos 21 aos 63 dias de idade, sobre ganho diário de peso, consumo diário de ração, conversão alimentar, incidência de diarreia dos animais, digestibilidade dos nutrientes da dieta, pesos (relativo e absoluto) dos órgãos, morfologia intestinal, pH do estômago e ceco, marcadores da resposta imune (Interleucinas (IL) IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (α) TNF- α), parâmetros sanguíneos e composição da microbiota do ceco dos leitões. Foram utilizados 200 leitões (100 machos e 100 fêmeas), com $5,58 \pm 0,65$ kg, alojados em grupos de 4 animais por baía e submetidos aos tratamentos: CN – controle negativo; EP1: CN + 1 % de EP; EP2: CN + 2% de EP; EP3: CN + 3% de EP; e CP – CN + 120 ppm de Halquinol. No 3º dia do experimento, cada animal foi inoculado com 1 mL com cepa de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), para promover o desafio sanitário. Além disso, utilizou-se a mesma cepa de ETEC para realização do teste *in vitro*. Não foram observados efeitos dos tratamentos ($P > 0,05$) sobre o desempenho, pesos (relativo e absoluto) dos órgãos, incidência de diarreia, morfologia intestinal, pH do estômago e ceco e parâmetros sanguíneos. A inclusão de EP e antibiótico contribuíram para a concentração de IL-10, aumentando, assim, a imunomodulação e diminuição da resposta inflamatória. A concentração de *Lactobacillus* foi maior no conteúdo do ceco dos animais que receberam a dieta EP3 ($P < 0,05$). Além disso, observou-se uma redução de 90,52%, 64,29%, 62,12% e 34,56% nos gêneros *Escherichia coli*, *Clostridium* 1, *Streptococcus* e *Campylobacter*, respectivamente, no conteúdo cecal dos animais alimentados com EP3 em relação aos do grupo controle. Os testes *in vitro* demonstraram o efeito bacteriostático e bactericida do EP a 6%.

Palavras-chave: suínos, aditivos, sistema imune, diversidade microbiana,

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of including pyroligneous extract (PE), replacing antibiotics as growth promoters (AGP) in diets for newly weaned piglets, from 21 to 63 days of age, on daily weight gain, daily feed intake, feed conversion, incidence of animal diarrhea, digestibility of nutrients, organ weights (relative and absolute), intestinal morphology, stomach and cecum pH, immune response markers (Interleukins (IL) IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor (α) TNF - α), blood parameters and microbial composition on cecum content. Two hundred $5,58 \pm 0,65$ kg piglets (100 males and 100 females) were housed in groups of 4 animals per pen and submitted to the following treatments: NC – negative control; PE1: NC + 1% PE; PE2: NC + 2% PE; PE3: NC + 3% PE; and PC – NC + 120 ppm of Halquinol. On the 3rd day of the experiment, each animal was inoculated with 1 mL of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain (ETEC): E, coli U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), to promote the sanitary challenge. In addition, the same strain of ETEC was used to perform the in vitro test. There were no effects of treatments ($P > 0,05$) on performance, organ weights (relative and absolute), diarrhea incidence, intestinal morphology, stomach and cecum pH and blood parameters. The inclusion of PE and antibiotics contributed to the concentration of IL-10, thus increasing immunomodulation and decreased inflammatory response. In contrast, the concentration of *Lactobacillus* was higher in the cecum content of animals that received the PE3 diet ($P < 0,05$). Furthermore, there was a reduction of 90,52%, 64,29%, 62,12% and 34,56% in the genera *Escherichia coli*, *Clostridium 1*, *Streptococcus* and *Campylobacter*, respectively, in the cecum content of piglets fed PE3 compared to NC piglets. In vitro tests demonstrated the bacteriostatic and bactericidal effect of 6% EP.

Keywords: swine, additives, wood vinegar, immune system, microbial diversity,

4.1. Introdução

O desmame é uma das fases mais desafiadoras na vida dos suínos, frequentemente acompanhada por redução no consumo de ração e desempenho reduzido (Leibbrandt et al., 1975; Bruininx et al., 2002a; Vente-Spreeuwenberg et al., 2003) que, em conjunto com os sistemas digestivo e imunológico imaturos dos suínos jovens, predispõem o leitão a distúrbios gastrointestinais, como elevada incidência de diarreia. Os principais efeitos de um sistema digestivo imaturo em leitões desmamados incluem redução da atividade das enzimas digestivas, mudanças na morfologia intestinal (Hampson, 1986; Boudry et al., 2004) e redução da digestão no intestino delgado. Em relação ao sistema imunológico, os leitões são extremamente imunodeficientes e dependem amplamente do leite de porca para imunidade, crescimento e sobrevivência (Stokes et al., 2001). Portanto, o manejo dos leitões durante o desmame é uma das tarefas mais desafiadoras no sistema intensivo de produção de suínos (Jayaraman & Nyachoti, 2017).

O comprometimento da capacidade digestiva e absorptiva induz a um efeito deletério na função da barreira intestinal (Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007). O epitélio intestinal atua como primeira linha de defesa do corpo para proteger o organismo de microrganismos patogênicos, toxinas ou antígenos que residem no lúmen do intestino delgado. Quando a barreira intestinal é rompida, o resultado é o aumento da permeabilidade que permite que toxinas, bactérias ou antígenos associados à alimentação atravessem o epitélio, resultando em um processo inflamatório, má absorção, diarreia e redução do crescimento e da produção (Moeser et al., 2007).

Uma das alternativas utilizadas para reduzir os impactos do desmame precoce na suinocultura industrial é a inclusão de antibióticos, em doses subterapêuticas, como melhoradores do desempenho. Sua eficiência em aumentar a taxa de crescimento, melhorar a utilização de alimentos e reduzir a mortalidade dos animais está bem documentada (Cromwell, 2002). O aumento do uso de antibióticos deu origem à preocupação do desenvolvimento de cepas bacterianas patogênicas resistentes (Wegener et al., 1999; Kyriakis et al., 1999; Budiño et al., 2005) e contaminação residual da cadeia alimentar com antibióticos (Chen et al., 2005; Roselli et al., 2005). Tal fato levou à adoção de medidas de segurança e à retirada gradual dos antibióticos das dietas de suínos. Em 2006, o uso de antibióticos como promotores de crescimento foi proibido na UE (Castro, 2005; Chen et al., 2005).

Nas últimas duas décadas, pesquisas foram desenvolvidas em busca de alternativas aos antibióticos para manter a saúde e o desempenho dos suínos. As alternativas mais pesquisadas incluem probióticos, prebióticos (Jacela et al., 2010), enzimas (Thacker et al., 2000; Jacela et al., 2009; Adeola & Cowieson, 2011), acidificantes (Jacela et al., 2009; Suruanarayana et al., 2012),

extratos de plantas (Windisch et al., 2008; Jacela et al., 2010; Liu et al., 2011) e nutracêuticos como cobre e zinco (Pettigrew et al., 2006; Jacela et al., 2010).

Nesse contexto, o extrato pirolenhoso (EP) é um composto com potencial para ser utilizado como melhorador de desempenho em dietas para suínos jovens. O EP é obtido após a condensação da fumaça formada pela carbonização da biomassa da madeira para produção de carvão vegetal. A biomassa consiste em grande parte de celulose, hemicelulose e lignina, polímeros complexos que são submetidos a várias transformações sob temperaturas elevadas (Araújo et al., 2017).

O processo de pirólise corresponde à decomposição térmica de material orgânico na ausência de oxigênio ou quando o oxigênio está presente em quantidade significativamente menor do que a necessária para a combustão completa. A pirólise da madeira é uma rota para a produção de carvão vegetal (sólido), alcatrão (líquido) e produtos gasosos como possíveis fontes alternativas de energia (Balat et al., 2009). O processo pode ser ajustado para favorecer a produção de carvão vegetal, líquido de pirólise, gás ou metanol (Demirbas, 2004). A temperatura é o fator mais importante para a distribuição do produto da pirólise. Em temperaturas mais altas, as moléculas maiores presentes no líquido e no sólido residual são quebradas para produzir moléculas menores que enriquecem a fração gasosa. Baixas temperaturas e altos tempos favorecem a produção de carvão vegetal, enquanto as temperaturas mais altas e os curtos tempos levam à alta produção de líquido (Bridgwater, 2003; Balat et al., 2009).

Em temperatura acima de 400°C os compostos menos voláteis presentes no carvão sólido são gradualmente expelidos, produzindo assim um produto com maior teor de carbono fixo e menor teor de carbono volátil. Posteriormente, a mistura destes gases e vapores percorre um cano de 10 metros de comprimento, ocorrendo condensação dos vapores condensáveis. O líquido pirolenhoso coletado é, posteriormente, deixado em repouso por um período 90 dias para que ocorra a decantação e purificação natural, resultando na formação de três fases: 1ª - o óleo na parte superior; 2ª - o EP líquido e translúcido de coloração amarela a marrom avermelhada na fase intermediária e 3ª - o alcatrão vegetal de consistência pegajosa e coloração escura na parte inferior (Wei et al., 2010).

O líquido de pirólise é referido na literatura por termos como alcatrão pirolenhoso, óleo de pirólise, bio-óleo, bio-óleo bruto, óleo biocombustível, líquido de madeira, óleo de madeira, fumaça líquida, ácido pirolenhoso, destilados de madeira, vinagre de madeira e mokusaku (Bridgwater, 2003; Loo et al., 2008) possui diversas formas de aplicação, dentre elas a agrícola, é composto por água, 80 a 90% (v/v), e uma mistura complexa de compostos, entre os quais mais de 200 compostos orgânicos decorrentes da degradação térmica da madeira, como ácido acético, álcoois, acetonas, ésteres e furanos. Além destes cita-se número significativo de compostos resultantes da degradação

térmica da lignina: fenol, guaiacol, siringol, pirocatecol e seus derivados (Adriansz et al., 2000; Guillén & Manzanos, 2002; Wei et al., 2010; Pimenta et al., 2018).

Vale ressaltar que, a composição química e concentração de compostos dependem intrinsecamente do tipo de material carbonizado (Pimenta et al., 2000; Nakai et al., 2007; Rakmai 2009; Pimenta et al., 2018). O EP obtido a partir de *Eucalyptus urograndis* caracteriza-se pela presença de altos teores de guaiacol e seus derivados que, juntamente com compostos fenóis e furfural podem conferir atividades antibacterianas e antifúngicas ao composto (Araújo et al., 2017).

Dentre os compostos que constituem o EP, o guaiacol é usado medicinalmente como um expectorante, anti-séptico e anestésico local, ao passo que, o fenol apresenta valor terapêutico como fungicida (O'Neil, 2013). O cresol é usado como antisséptico local, desinfetante e como antisséptico intestinal (O'Neil, 2013). O furfural (2-furaldeído) é encontrado na pimenta da Jamaica, é um ingrediente flavorizante e pode atuar como fungicida (Abdel-Kahr et al., 2015) e, além disso, também possui atividade nematicida (Ismail; Mohamed, 2007; Crow; Luc, 2014).

Provavelmente, as propriedades antibacterianas e antifúngicas do EP de diferentes fontes não podem ser atribuídas a um único composto, mas a uma combinação de vários, como apontado por Yang et al., (2016). Tal fato foi constatado no trabalho de Choi et al., (2009), que avaliaram a inclusão do EP de *Quercus acutíssima*, em teores crescentes (0,1; 0,2 e 0,3%) em dietas para leitões recém-desmamados e verificaram melhorias no desempenho, na digestibilidade dos nutrientes das dietas e na diversidade microbiana no TGI dos animais. Os autores atribuíram esses efeitos aos ácidos orgânicos (3,99% ácido acético e 10,89% ácido propiônico) presentes no extrato.

Além disso, outros trabalhos constataram o efeito benéfico da adição de EP na alimentação de animais não ruminantes. Como relatado por Ahn (2005) a adição de EP em 0,2% na ração de leitões resultou em melhorias na conversão alimentar e digestibilidade de nutrientes e diminuição de coliformes intestinais patogênicos. Com a mesma inclusão de EP na ração de frangos, Shim et al, (2010) relataram redução na emissão de gases tóxicos nas excretas, além de efeitos positivos nos parâmetros nutricionais da carne.

Diante do exposto e da escassez de estudos científicos explorando a utilização do EP de *Eucalyptus urograndis* como fonte alternativa à substituição de antibióticos, estudos são necessários para verificar o seu potencial na dieta de leitões recém-desmamados. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes níveis do EP de *Eucalyptus urograndis* na alimentação de leitões recém-desmamados, sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade dos nutrientes da dieta, morfologia intestinal, peso de órgãos, sistema imunológico e composição da microbiota intestinal.

4.1. Material e métodos

O presente estudo foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – Universidade de São Paulo (USP) (SP, Brasil) sob o protocolo de número 2019-27. O experimento foi realizado na instalação de creche do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil.

Foram utilizados 200 leitões (100 machos castrados e 100 fêmeas), divididos em dois lotes de 100 animais cada, obtidos de um rebanho suíno comercial, mestiços, desmamados aos 21 dias de idade e com $5,58 \pm 0,65$ kg de peso vivo médio inicial. Os animais foram alojados em grupos de quatro (dois machos e duas fêmeas), de acordo com o peso vivo inicial, em 25 baias suspensas de 1,80 m² (1,20 x 1,50m) cada, com piso parcialmente ripado, comedouro semiautomático, bebedouro tipo chupeta e aquecimento com lâmpada infravermelha de 250W.

4.1.1. Dietas experimentais

Os animais foram submetidos a um programa de alimentação em 3 fases: pré-inicial (0 a 7 dias após o desmame), inicial I (8 a 21 dias após o desmame) e inicial II (22 a 42 dias após o desmame), para atender as exigências nutricionais de suínos de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2017). As dietas (Tabela 8) foram distribuídas em cinco tratamentos, sendo eles: CN - controle negativo sem adição de aditivo promotor de crescimento; CP - controle positivo, CN + antibiótico (halquinol, 120 ppm); EP1 - CN com inclusão de 1% do extrato pirolenhoso; EP2 - CN com inclusão de 2% do extrato pirolenhosos (EP2); e EP3 - CN com inclusão de 3% do extrato pirolenhoso (EP3). Água foi utilizada como inerte, a fim de garantir que todas as dietas apresentassem o mesmo teor de umidade.

4.1.2. Desafio sanitário

No terceiro dia do experimento os leitões foram submetidos a desafio sanitário, que consistiu na inoculação via oral com solução contendo *Escherichia coli*. Para o preparo do inóculo, trabalhou-se com uma cepa de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), isolada do trato gastrointestinal de suínos.

Inicialmente, a cepa de ETEC foi ativada em caldo de cultivo “Brain Heart Infusion” (BHI) e, sequencialmente, 1 mL do caldo contendo a bactéria foi transferido para um tubo contendo 25 mL de caldo BHI estéril, o qual foi incubado a 37°C por 20h. O processo de

ativação foi repetido por mais duas vezes, sendo, no total, realizados três processos de ativação consecutivos da bactéria. Após os três dias de ativação, retirou-se o tubo da incubadora, que foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, para obtenção do pelete bacteriano, que foi ressuspenso em 30 mL de solução salina de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,85%, sendo a densidade populacional bacteriana de aproximadamente $8-9 \times 10^8$ UFC/mL. A partir desta suspensão foi feita uma diluição de 1:20 em solução salina estéril (0,85% NaCl) para atingir uma população aproximada de $4-6 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi o inóculo final ou inóculo de trabalho utilizado para a inoculação dos leitões.

Para confirmar a densidade populacional do inóculo final foi realizada a contagem em agar Tryptic Soy Agar (TSA) em triplicata. Os inóculos utilizados no primeiro e segundo lotes do experimento contiveram $6,4 \times 10^7$ e $5,7 \times 10^7$ UFC/mL de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): E. coli U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), respectivamente, e cada animal recebeu oralmente 1 mL do inóculo (Lund et al., 1991; Genovese et al., 2001; Sugiharto et al., 2015, Barreto, 2019).

Composição calculada

Energia líquida (kcal/kg)	2520	2481	2462
Proteína bruta (%)	21,39	19,84	20,28
Cálcio (%)	1,07	0,97	0,88
Fósforo DTE (%)	0,51	0,47	0,42
Lisina DIE (%)	1,45	1,35	1,25

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; **CP** – controle positivo, com adição do antibiótico halquinol; **EP1** – dieta com adição de 1% extrato pirolenhoso; **EP2** – dieta com adição de 2% extrato pirolenhoso; **EP3** – dieta com adição de 3% extrato pirolenhoso; ¹Pré-mistura vitamínica, por kg da dieta: selênio, 40mg/kg; vitamina A, 900000UI/kg; vitamina D3, 200000UI/kg; vitamina E, 5400UI/kg; vitamina K3, 400mg/kg; tiamina, 180mg/kg; riboflavina, 500mg/kg; niacina, 4g/kg; ácido pantotênico, 2,1g/kg; piridoxina, 290mg/kg; cianocobalamina, 3000mcg/kg; ácido fólico, 45mg/kg; biotina, 16mg/kg; ²Premix mineral, por kg da dieta: cobre, 1,3g/kg; ferro, 10g/kg; manganês, 5g/kg; zinco, 9,7g/kg; iodo, 100mg/kg; Dióxido de titânio (TiO₂): indicador de indigestibilidade.

4.1.3. Desempenho zootécnico e incidência de diarreia

Durante todo o período experimental de 42 dias, os animais receberam água e ração à vontade. Os leitões foram pesados nos 1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias do período experimental para cálculo do ganho diário de peso (GPD). Além disso, quantificou-se as rações fornecidas, bem como as sobras de ração nos comedouros e as porções que foram desperdiçadas pelos animais, para a determinação do consumo diário de ração (CDR), para cálculo da conversão alimentar (CA) (CDR/GDP).

A presença de diarreia (fezes líquidas) ou sua ausência (fezes normais) foi avaliada a partir da observação visual de sinais de diarreia em cada animal. Diariamente, o mesmo indivíduo, quantificou o número de animais com presença e ausência de diarreia em cada baia. Para cada baia, fez-se a média do número de observações indicando a presença de diarreia em relação ao número de animais na baia. A partir deste número, calculou-se a percentagem de dias com diarreia no período experimental de acordo com Milani et al., (2017):

$$DO (\%) = \{[(P1 \times D) + (P2 \times D) + (Pn \times D)] / n / TD\} \times 100,$$

Em que: DO (%) é a percentagem média de dias que os leitões apresentaram diarreia em cada baia; P(1, 2...n) representa cada leitão dentro da baia (n), D é o número de dias em que cada leitão apresentou diarreia dentro da baia, TD é o número de dias de cada fase do programa nutricional utilizado,

4.1.4. Parâmetros sanguíneos

Para quantificação dos parâmetros sanguíneos foram realizadas coletas de sangue nos 7º e no 21º dia do experimento. Foi selecionado um animal (macho) por baia, com peso médio mais próximo a média de peso dos animais. A coleta foi realizada por punção na veia cava anterior. O animal selecionado foi disposto em posição de decúbito dorsal sobre um suporte para coleta, a região de coleta foi limpa e desinfetada com algodão embebido em álcool 70%. A coleta foi realizada a vácuo utilizando agulha múltipla 25 x 0,8 mm em tubo coletor de sangue, tampa roxa, contendo anticoagulante K3EDTA (VACUETTE®, Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil) e em tubo coletor de sangue com soro ativador de coagulação, tampa vermelha, CAT Ativador de Coágulo (VACUETTE®, Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil).

O hemograma foi realizado pelo método automático (Cell dyn 3500, ABBOTT, Chicago, Estados Unidos da América) e constou da avaliação de parâmetros da série vermelha

(eritrócitos), da série branca (leucócitos) e da série plaquetária (plaquetas). A análise da série vermelha foi constituída pelas seguintes determinações: contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (V,c,m.), concentração da hemoglobina corpuscular média (C,h,c,m.), metarrubricitos e proteína total. A série branca foi analisada para os seguintes índices: contagem total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos (eosinófilos, basófilos, heterófilos, linfócitos típicos, células atípicas, mielócitos, metamielócitos, monócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados). A série plaquetária correspondeu à contagem de plaquetas.

As concentrações das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α no soro dos leitões foram determinadas usando o kit ELISA (TermoFisher, Waltham, Massachusetts, EUA), seguindo as instruções dos fabricantes.

4.1.5. Eutanásia de leitões

No 14º dia do experimento, quando os animais completarem 37 dias de idade, efetuou-se eutanásia de um animal por unidade experimental para pesagem de órgãos, coleta de amostras de tecidos do duodeno e do jejuno para avaliação da morfologia do epitélio intestinal e coleta de conteúdo do ceco e quantificação das populações de microrganismos. Os animais sacrificados foram insensibilizados por eletronarcose (1,3 A por 3 segundos, 240 V) e em seguida eutanasiados por exsanguinação,

4.1.6. Peso de órgãos e mensuração do pH

Após o abate, estômago, fígado, intestinos delgado e grosso, ceco, rins, pulmão, coração e baço foram removidos e pesados, assim como as carcaças evisceradas. Foram determinados os pesos absolutos dos órgãos, e seus pesos em relação ao peso de carcaça. Para pesagem, separou-se a vesícula biliar do fígado e procedeu-se o esvaziamento do estômago e dos intestinos. Além disso, foi realizada a mensuração dos intestinos delgado e grosso, utilizando uma fita métrica fixa em mesa.

Imediatamente após o abate dos animais, foi realizada a mensuração do pH dos conteúdos do estômago e ceco com auxílio de um potenciômetro digital (Modelo tec-5, tecnal Ltda, Piracicaba-SP, Brasil), conforme metodologia descrita por Grecco et al, (2018).

4.1.7. Histologia do epitélio intestinal

Para avaliação da morfologia do epitélio intestinal, foram coletadas amostras de 3 cm do duodeno (15 cm a partir da válvula pilórica) e de 3 cm do jejuno (a 150 cm da junção

ileocecal) do animal abatido. As amostras foram lavadas em solução salina (0,85% de NaCl), fixadas em solução de formol tamponado neutro a 10% por 72 horas e, posteriormente, foram lavadas e armazenadas em álcool etílico 70% e, a partir destas confeccionadas lâminas histológicas, coradas pelo método hematoxilina-eosina (AFIP, 1994).

A partir destas lâminas, foram realizados registros de imagens utilizando um microscópio óptico (BELKIN, 2000) com um sistema de análise de imagens acoplado. Posteriormente foram realizadas as mensurações de altura de vilosidade e profundidade de cripta. Utilizou-se aumento de 10X e foram realizadas mensurações em 15 vilosidades e 15 criptas por lâmina.

4.1.8. Digestibilidade de nutrientes das dietas

Para determinar as digestibilidades dos nutrientes das dietas foi utilizado o método de coleta parcial de fezes (Adeola 2021), com a inclusão de 0,3% de dióxido de titânio (TiO₂) às dietas na fase pré-inicial II, como indicador de indigestibilidade. Após o início do consumo da ração com indicador, foi estabelecido um período de 5 dias para manutenção do seu fluxo no trato digestório dos animais e, posteriormente, realizou-se a coleta de fezes dos animais de cada unidade experimental, durante dois dias, diretamente do piso das baias.

Após as coletas, as fezes da baia foram homogeneizadas e armazenadas em sacos plásticos a -18°C para posterior análise. Além disso, as amostras de ração também foram coletadas e armazenadas. Posteriormente, as amostras de fezes foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas e secas a 65°C por um período de 72 horas. Após a secagem, as amostras de fezes e ração foram moídas e submetidas às análises laboratoriais para determinação de matéria seca (MS), extrato etéreo (EE), energia bruta (EB) e proteína bruta (PB) (AOAC, 2006), e de TiO₂ (MYERS et al., 2004).

A determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente foi realizada utilizando a equação proposta por ADEOLA (2001):

Digestibilidade aparente total (%) = $100 - [100 \times (\text{concentração do indicador na dieta} \times \text{concentração do componente nas fezes} / \text{concentração do indicador nas fezes} \times \text{concentração do componente na dieta})]$.

4.1.9. Avaliação de populações microbianas no conteúdo cecal

Nos animais abatidos foram coletadas amostras do conteúdo cecal em criotubos de 2,5 mL, que foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido e enviados para análise em

laboratório. As amostras foram enviadas para o laboratório NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP) e, posteriormente, foram avaliadas as abundâncias relativas dos gêneros bacterianos no conteúdo do ceco dos leitões. Inicialmente realizou-se a coleta do conteúdo do ceco dos animais, seguida de extração do DNA bacteriano, de sua quantificação e posteriormente sequenciamento para identificação e quantificação dos gêneros presentes.

A extração de DNA foi realizada utilizando o MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher), incluindo adaptações para a extração de todos os microrganismos, incluindo aqueles que apresentam parede celular espessa. Antes do processamento com o Kit, foi incluída uma etapa de lise mecânica realizada em um equipamento que lisa o tecido e rompe simultaneamente várias amostras biológicas por agitação em alta velocidade utilizando *beads* de vidro. A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose e quantificada em Nanodrop. O equipamento KingFisher (ThermoFisher) foi utilizado para a extração.

O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações Illumina. Os primers utilizados para amplificação locus-específica de bactérias flanqueia a região V4. Sequência overhang de adaptadores está incluída nos primers locus-específicos. As sequências de adaptadores Illumina, que foram hibridizadas com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são:

Forward overhang: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

Reverse overhang: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica].

O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina Miseq e as leituras produzidas foram de 2x250 pb. Inicialmente a primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica. Em seguida, AMPure XP beads foram utilizadas para purificação da reação de PCR, e o tamanho dos fragmentos gerados na reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose. A segunda PCR foi realizada para ligar os barcodes do kit Nextera XT, e novas etapas de purificação da PCR e validação das bibliotecas foram realizadas. Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas, para que todas as amostras/bibliotecas fossem unidas de maneira equimolar em um único pool.

Para introduzir complexidade ao sequenciamento, um controle heterogêneo, o fago phi-X, foi combinado com o pool de amplicons. Por fim, foi feita a desnaturação das bibliotecas e do phi-X, para permitir o sequenciamento.

Primeiro, as leituras multiplexadas foram atribuídas em amostras biológicas. O programa DADA2 (Callahan et al., 2016), um pacote de código aberto implementado na linguagem R, foi utilizado para modelagem e correção de erros de amplicons, sem a construção de OTUs. Estudos mostram que em várias comunidades simuladas, DADA2 identificou variantes mais reais e produziu menos sequências espúrias que outros métodos (Callahan et al., 2016). O pacote DADA2 tem um pipeline completo implementado para transformar os arquivos fastq do sequenciador em sequências de amostras inferidas, desmembradas, e sem quimeras. A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências dos primers de PCR e filtrar as extremidades 3' das leituras devido ao decaimento da qualidade ($Q < 30$). Após a filtragem, as reads ficaram com um tamanho de 2 x 260 pb, mantendo a sobreposição para posterior junção das leituras e remontagem do fragmento da região V3-V4.

Após o processamento inicial dos dados de sequenciamento pelo DADA2, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês Amplicon Sequencing Variants) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade. A função assignTaxonomy toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias. O banco de dados Silva 132 foi utilizado como referência.

As classificações taxonômicas, e suas quantificações, gerados pelo DADA2 foram importados para o programa Phyloseq (Mcmurdie; Holmes, 2013), também implementado no R. Foram filtradas as ASVs que não foram classificadas em pelo menos até o nível de família, e ASVs assinaladas como a mesma espécie foram aglomeradas. Também foram filtradas as ASVs que não estavam presentes em pelo menos 5% das amostras. Após, o arquivo phyloseq com as contagens das taxonomias foi importado para o programa edgeR (Robinson et al., 2010), um pacote do R/Bioconductor (Gentleman et al., 2004). Para análise de abundância diferencial entre grupos, os pacotes limma voom foram utilizados para normalização, juntamente com o edgeR.

4.1.10. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana do extrato pirolenhoso

Para determinação da atividade antibacteriana do EP *in vitro* utilizou-se duas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* U7 (K88 + / LT + / STb +) e *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +) isoladas do trato gastrointestinal de suínos. As cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Saúde Suína do Departamento de Medicina Veterinária

Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1.11. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição utilizando uma microplaca de 96 poços seguindo o protocolo M07-A9 Metodologia para Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Para o teste, o inóculo padrão de cada bactéria foi preparado em solução salina de cloreto de sódio 0,85%, a partir de colônias vivas de cada cepa de ETEC, contidas em uma placa de Ágar TSA, na densidade óptica do padrão 0,5 Mc Farland (0,08 - 0,13 a 625 nm) correspondente a 10^8 UFC/mL. Este inóculo padrão foi diluído 1:100 para obter-se um inóculo de 1×10^6 UFC/mL (Inóculo Final).

A solução estoque do EP foi preparado a uma concentração 12% v/v com Caldo Müeller Hinton (sem adição de emulsificante devido a sua boa solubilização no caldo). A partir da solução estoque foram feitas as diluições duplas seriadas em uma faixa de 6 a 0,047 % v/v ao longo do eixo Y da microplaca. Vinte microlitros do inóculo final foram adicionados a cada poço contendo 180 μ L das diversas concentrações do EP, sendo o volume final em cada poço de 200 μ L e população bacteriana de aproximadamente 105 UFC/mL. Foram utilizados os seguintes controles: controle do meio de cultura (200 μ L de caldo MH) e controle de crescimento (180 μ L de caldo MH + 20 μ L de inóculo).

As microplacas foram incubadas em um leitor de microplacas (Vitor™ X3, PerkinElmer) a 37°C por 24 horas. A CIM foi estabelecida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano visível. A existência ou não de crescimento bacteriano foi avaliada pela construção de curvas de sobrevivência e pelo teste de resazurina ao final do período de incubação. A menor concentração que não produziu valores de absorbância detectáveis (a 600 nm) até o final da incubação foi considerada como a CIM obtida pelas curvas de sobrevivência. Para o teste de resazurina, 25 μ L de solução de resazurina (R7017; Sigma-Aldrich) a 0,0135% m/v foram adicionados a cada poço da microplaca. Portanto, após inspeção visual, a presença de células viáveis foi evidenciada por uma mudança na cor da resazurina, de azul de resazurina a rosa resofurina, após 20 min de incubação adicional a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata em três repetições independentes.

4.1.12. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada a partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível. Assim, retirou-se uma alíquota de 50 µL de cada poço e semeou-se superficialmente em ágar Muller-Hinton. Após o período de incubação, 18-20 h a 37°C, foi definida a concentração bactericida mínima como a menor concentração do EP capaz de causar a inativação total da bactéria representada pela ausência de crescimento de colônias no ágar.

4.1.13. Delineamento experimental e análises estatísticas

Foi adotado o delineamento experimental em blocos completos casualizados com cinco tratamentos, 10 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental composta por quatro animais (baia) para as avaliações de desempenho zootécnico e digestibilidade de dietas e um animal para as demais avaliações. Os blocos foram formados de acordo com o peso inicial dos animais.

Os dados foram submetidos a testes para verificação da adequação ao modelo linear e da não violação das pressuposições da análise de variância e submetidos à análise da variância utilizando-se o procedimento MIXED do SAS® (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). O modelo matemático incluiu os efeitos fixos dos tratamentos, os efeitos aleatórios dos blocos nas avaliações de 1 a 7 dias e o peso dos animais como covariável nas demais avaliações e o erro experimental. Considerou-se diferença estatística quando o valor de P foi inferior a 0,05 e tendência quando inferior a 0,1.

4.2. Resultados

4.2.1. Desempenho e incidência de diarreia

Ao longo do período experimental, 1 a 42 dias, não se verificou diferença para as variáveis peso vivo, GDP e CDR (Tabela 9). Em contrapartida, no período de 8 a 14 dias verificou-se diferença na CA ($P < 0,05$), sendo que os animais que receberam o tratamento EP1 apresentaram pior CA em comparação aos animais alimentados com os tratamentos CN, CP e EP2. Não houve efeitos dos tratamentos sobre a frequência de diarreia nos leitões desmamados (Tabela 10).

Tabela 9: Ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA - CDR/GDP) de leitões desmamados, alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano ou com os aditivos halquinol e extrato pirolenhoso (EP) dos 24 aos 66 dias de vida.¹

Itens	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
GDP (g/d)							
Dias 1–7	261,8	280,5	268,3	275,9	259,9	8,81	0,355
Dias 8–14	371,7	408,5	332,8	413,5	392,4	16,9	0,226
Dias 15–21	553,0	516,3	511,6	504,6	557,5	16,8	0,414
Dias 22–28	491,5	563,0	543,9	516,6	534,8	14,0	0,564
Dias 29–35	593,3	594,8	555,3	566,9	589,4	15,0	0,904
Dias 36–42	647,2	687,5	638,4	677,5	647,7	16,1	0,854
CDR (g/d)							
Dias 1–7	283,3	295,8	280,0	282,9	250,6	10,8	0,528
Dias 8–14	478,5	507,6	473,6	507,4	504,4	18,0	0,799
Dias 15–21	610,1	575,4	588,2	577,1	618,2	19,8	0,553
Dias 22–28	812,0	827,2	848,5	897,3	961,6	19,5	0,060
Dias 29–35	964,1	1014,5	994,4	1038,3	996,4	25,2	0,795
Dias 36–42 d	1161,2	1220,3	1215,3	1351,2	1222,4	29,7	0,123
CA (CDR/GDP)							
Dias 1–7	1,08	1,05	1,03	1,02	1,05	0,02	0,306
Dias 8–14	1,21 ^a	1,24 ^a	1,40 ^b	1,23 ^a	1,32 ^{ab}	0,02	0,007
Dias 15–21	1,15	1,13	1,16	1,15	1,11	0,02	0,879
Dias 22–28	1,72	1,54	1,61	1,80	1,83	0,06	0,419
Dias 29–35	1,68	1,74	1,82	1,86	1,75	0,05	0,626
Dias 36–42	1,81	1,80	1,95	2,02	1,96	0,06	0,518

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 10: Frequência de diarreia de leitões desmamados, alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano ou com halquinol e extrato pirolenhoso (EP) dos 24 aos 66 dias de vida,

Item	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
Frequência de diarreia, %							
Dias 1–7	17,68	12,32	9,58	17,26	14,05	1,25	0,246
Dias 8–14	21,79	18,21	21,43	30,36	25,36	1,84	0,190
Dias 15–21	10,67	23,71	13,71	19,81	14,19	2,86	0,191
Dias 22–28	6,75	3,17	5,56	3,17	4,17	1,19	0,998
Dias 29–35	6,67	2,86	6,67	10,00	6,67	1,37	0,735
Dias 36–42	9,17	2,22	8,89	11,11	9,72	1,85	0,405
Dias 1 a 42	12,22	10,19	11,00	15,36	12,39	1,04	0,521

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

4.2.2. Parâmetro sanguíneos

Não houve diferença entre os valores médios de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM e proteína total (Tabela 11) no 7º dia do experimento, bem como não se verificou efeitos para os valores de leucócitos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e IL-10 (Tabela 12) no 7º e 21º dias no sangue de leitões alimentados com dietas sem adição de qualquer aditivo zootécnico, com halquinol ou com EP.

Em contrapartida, os animais que receberam a dieta CP apresentaram maiores ($P<0,05$) valores de hematócrito do que os submetidos à dieta CN e maiores ($P<0,05$) teores de proteína total sanguínea do que os leitões EP3 no 21º dia do experimento (Tabela 11). Os animais que receberam a dieta EP3 tiveram maior ($P<0,05$) concentração de plaquetas no sangue do que os leitões alimentados com as dietas CN e EP2 no 7º dia de experimento (Tabela 12).

Não foram detectadas as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e a IL-6 foi verificada somente em poucos animais, aspecto que impediu a avaliação estatística destas variáveis.

Tabela 11: Valores de C,h,c,m,, hemácias, hemoglobina, hematócrito, proteína total e V,c,m, sanguíneos, nos dias 7 e 21 do experimento, de leitões alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano ou com halquinol e extrato pirolenhoso (EP) dos 24 aos 66 dias de vida.¹

Items	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
Dia 7							
Hemácias, 10 ⁶ / μ L	5,93	6,24	5,94	6,12	6,42	0,13	0,481
Hemoglobina, g/dL	10,34	10,58	10,31	10,19	10,58	0,25	0,915
Hematócrito, %	34,75	36,10	34,60	35,05	35,30	0,70	0,912
VCM ³ , fL	58,94	58,17	58,47	57,58	55,19	0,70	0,386
CHCM ⁴ , %	29,68	29,24	29,69	28,96	29,84	0,21	0,186
Proteína total, 10 ³ / μ L	5,45	5,54	5,58	5,50	5,64	0,05	0,783
Dia 21							
Hemácias, 10 ⁶ / μ L	6,24	6,73	6,29	6,30	6,38	0,12	0,576
Hemoglobina, g/dL	9,84	11,49	10,82	10,92	10,69	0,18	0,055
Hematócrito, %	33,40 ^b	38,20 ^a	36,15 ^{ab}	35,40 ^{ab}	34,75 ^{ab}	0,50	0,027
VCM, fL	54,62	57,30	58,07	56,41	54,93	0,86	0,668
CHCM, %	29,30	30,07	29,93	30,86	30,74	0,22	0,090
Proteína total, 10 ³ / μ L	5,94 ^{ab}	6,04 ^a	5,82 ^{ab}	5,76 ^{ab}	5,69 ^b	0,04	0,023

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta nos dias 7 e 21.

² EPM = Erro Padrão da Média.

³ Volume corpuscular médio.

⁴ Concentração da hemoglobina corpuscular média.

^{ab}Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Tabela 12: Leucograma e teores de interleucina sanguíneos de leitões, nos dias 7 e 21 do experimento, alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano ou com os aditivos halquinol e extrato pirolenhoso dos 24 aos 66 dias de vida.¹

Items	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
Dia 7							
Leucócitos, 10 ³ /μL	11,94	14,72	16,41	13,90	13,62	0,62	0,116
Eosinófilos, %	0,75	1,10	1,45	1,75	1,30	0,15	0,292
Neutrófilos, %	35,90	43,70	42,95	37,70	41,45	1,51	0,333
Linfócitos, %	60,95	53,20	53,10	58,70	51,40	1,52	0,200
Monócitos, %	2,35	1,85	2,15	1,55	2,05	0,18	0,576
Plaquetas, 10 ³ /μL	571,7 ^b	626,9 ^{ab}	638,9 ^{ab}	523,5 ^b	708,6 ^a	18,42	0,007
Interleucina 10, pg/mL	14,91	10,66	9,09	9,11	10,22	0,84	0,191
Dia 21							
Leucócitos, 10 ³ /μL	17,11	19,24	14,81	15,07	14,78	0,70	0,173
Eosinófilos, %	1,20	0,65	1,15	0,75	1,05	0,13	0,615
Neutrófilos, %	32,15	26,05	29,15	30,50	32,25	1,45	0,432
Linfócitos, %	64,65	71,30	67,30	66,40	65,00	1,52	0,367
Monócitos, %	1,85	1,80	2,10	2,20	1,50	0,20	0,815
Plaquetas, 10 ³ /μL	575,05	532,35	480,05	512,80	560,80	16,17	0,353
Interleucina 10, pg/mL	13,18	20,51	11,55	10,44	15,20	1,78	0,388

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; **CP** – dieta controle positivo, com halquinol; **EP1** – dieta com 1% de EP; **EP2** – dieta com 2% de EP; **EP3** – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.2.3. Peso dos órgãos e pH estômago e ceco

Não houve diferença (P>0,05) para os pesos, absoluto e relativo, do pulmão, coração, rins, fígado, baço, estômago, intestinos grosso e delgado, e ceco e comprimentos dos intestinos delgado e grosso. Do mesmo modo, não houve diferença (P>0,05) nos pHs do estômago e ceco dos animais que receberam as dietas experimentais (Tabela 13).

Tabela 13: Pesos, absoluto e relativo, do pulmão, coração, rins, fígado, baço, estômago, intestinos grosso e delgado, e ceco, comprimentos dos intestinos delgado e grosso e pH dos conteúdos do estômago e do ceco de leitões abatidos aos 35 dias de idade e alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano (controle negativo) ou com os aditivos halquinol e extrato pirolenhoso (EP).¹

Item	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
Pulmão							
Absoluto, g	14,65	14,63	13,52	15,96	14,05	0,49	0,445
Relativo, %	2,31	2,12	2,14	2,31	2,20	0,06	0,619
Coração							
Absoluto, g	5,01b	5,89ab	5,43ab	6,39a	5,22b	0,21	0,010
Relativo, %	0,86	0,93	0,92	1,00	0,89	0,02	0,179
Rins							
Absoluto, g	6,98	7,42	6,60	7,69	6,73	0,21	0,361
Relativo, %	1,04	1,03	0,97	1,05	0,99	0,02	0,644
Fígado							
Absoluto, g	333,5	340,0	324,7	370,9	333,3	1,08	0,711
Relativo, %	5,05	4,80	4,90	5,18	4,99	0,09	0,716
Baço							
Absoluto, g	1,88	2,13	1,84	2,12	2,09	0,08	0,705
Relativo, %	0,30	0,30	0,28	0,30	0,32	0,01	0,881
Estômago							
Absoluto, g	10,99	11,94	11,30	11,30	10,65	0,32	0,729
Relativo, %	1,62	1,67	1,68	1,53	1,58	0,04	0,792
pH	3,28	3,18	2,88	2,71	3,12	0,14	0,734
Intestino grosso							
Comprimento, m	2,89	2,48	2,39	2,64	2,39	0,08	0,173
Absoluto, g	222,4	240,7	201,9	228,5	202,7	0,74	0,398
Relativo, %	3,46	3,45	3,08	3,19	3,06	0,12	0,730
Intestino delgado							
Comprimento	13,20	13,28	12,33	13,44	12,50	0,18	0,171
Absoluto, g	59,45	61,08	59,61	63,23	56,53	1,89	0,859
Relativo, %	8,89	8,72	8,95	8,69	8,61	0,26	0,994
Ceco							
Absoluto, g	3,57	3,54	3,84	3,83	3,40	0,09	0,429
Relativo, %	0,52	0,48	0,57	0,52	0,51	0,01	0,299
pH	5,27	5,59	5,54	5,73	5,71	0,07	0,215

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

4.2.4. Histologia do epitélio intestinal

Não houve diferença ($P > 0,05$) para altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC) e na relação (AV/PC) dos leitões que receberam as dietas sem aditivo antimicrobiano ou com a inclusão de halquinol e EP (Tabela 14).

Tabela 14: Altura média das vilosidades (AV), profundidade da cripta (PC), e razão AV / PC no duodeno e jejuno de leitões abatidos aos 35 dias de idade e alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano (controle negativo) ou com os aditivos halquinol e extrato pirolenhoso.¹

Item	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
Duodeno							
AV, μm	337,19	335,31	336,44	369,64	326,19	8,77	0,458
PC, μm	310,92	323,96	329,01	301,32	304,58	6,63	0,634
AV/PC	1,10	1,07	1,04	1,24	1,09	0,04	0,425
Jejuno							
AV, μm	238,63	256,13	286,98	256,02	254,99	6,84	0,236
PC, μm	178,30	176,95	203,12	178,88	187,93	4,26	0,253
AV/PC	1,42	1,55	1,52	1,52	1,46	0,04	0,894

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

4.2.5. Digestibilidade de nutrientes das dietas

Não houve diferença ($P > 0,05$) na digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia das dietas sem aditivo antimicrobiano ou com a inclusão de halquinol e EP em leitões na fase pré-inicial II (Tabela 15),

Tabela 15: Digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia de dietas sem aditivo antimicrobiano ou com halquinol e extrato pirolenhoso (EP) para leitões na fase pré – inicial II.¹

Item	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
Digestibilidades, %							
Matéria seca	84,38	84,16	83,75	84,77	84,11	0,21	0,638
Proteína bruta	80,46	80,74	79,85	81,60	80,50	0,34	0,584
Extrato etéreo	70,29	68,42	69,00	70,84	70,37	0,59	0,416
Fibra em detergente neutro	57,67	56,84	56,61	57,76	56,93	0,63	0,964
Fibra em detergente ácido	58,45	57,20	54,54	60,54	57,29	0,88	0,152
Energia bruta	85,36	84,85	84,27	84,93	85,21	0,24	0,609

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

4.2.6. Avaliação de populações microbianas no conteúdo cecal

A população de microrganismos do gênero *Lactobacillus* foi maior ($P < 0,05$) no conteúdo do ceco dos animais que receberam as dietas CN, EP1, EP2 e EP3 em comparação aqueles alimentados com a dieta contendo o antimicrobiano halquinol (Tabela 16). Comparando-se os animais que receberam as dietas CN, EP1, EP2 e EP3 observou-se efeito linear crescente ($P < 0,05$) no aumento da população de *Lactobacillus* de acordo com a crescente adição de EP às dietas, sendo a abundância de microrganismos desse gênero 50% superior no conteúdo do ceco dos animais EP3 comparativamente aos leitões CN. Além disso, observou-se

uma redução numérica nas populações de *Campylobacter*, *Clostridium* e *Streptococcus* e *Escherichia coli* da ordem de 34, 6; 64;3; 90,5 e 62,1 no conteúdo cecal dos animais que receberam o tratamento EP3 em comparação aos animais alimentados com a ração CP.

Tabela 16: Abundância relativa de gêneros de microrganismos no conteúdo do ceco de leitões com 37 dias de idade, alimentados com dieta sem aditivo antimicrobiano ou com halquinol e extrato pirolenhoso (EP).¹

Items	Dietas					EPM ²	P
	CN	CP	EP1	EP2	EP3		
<i>Agathobacter</i>	4,32	4,17	3,96	3,26	3,64	0,43	0,915
<i>Alloprevotella</i>	1,96	1,58	2,32	2,19	1,92	0,19	0,790
<i>Anaerovibrio</i>	4,72	5,97	3,58	3,98	5,84	0,60	0,597
<i>Bifidobacterium</i>	0,74	0,52	0,79	1,13	0,18	0,14	0,304
<i>Blautia</i>	2,05	3,08	3,15	2,31	3,23	0,23	0,229
<i>Campylobacter</i>	1,26	1,36	1,38	1,45	0,89	0,22	0,925
<i>Clostridium 1</i>	0,63	0,14	0,09	0,66	0,05	0,12	0,126
<i>Clostridium 6</i>	0,06	0,03	0,10	0,06	0,02	0,01	0,256
<i>Escherichia/Shiggella</i>	1,00	7,81	4,05	9,83	0,74	1,67	0,189
<i>Faecalibacterium</i>	2,01	2,71	3,43	2,70	3,06	0,22	0,367
<i>Lachnospira</i>	0,45	0,29	0,33	0,25	0,23	0,05	0,619
<i>Lactobacillus</i> ³	21,57 ^{ab}	20,93 ^b	25,76 ^a	29,15 ^a	32,54 ^a	1,47	0,032
<i>Megasphaera</i>	10,33	7,51	9,07	7,98	12,64	0,75	0,216
<i>Peptococcus</i>	0,13	0,14	0,07	0,07	0,08	0,01	0,062
<i>Prevotella</i>	14,58	13,59	13,55	13,65	13,88	0,84	0,989
<i>Prevotellaceae UCG003</i>	0,13	0,13	0,15	0,05	0,03	0,02	0,318
<i>Prevotellaceae NK3B31</i>	0,94	0,54	1,19	0,74	0,86	0,08	0,053
<i>Ruminococaceae</i>	0,05	0,07	0,06	0,04	0,04	0,01	0,718
<i>Ruminococcus</i>	1,01	0,57	0,61	0,59	0,44	0,10	0,846
<i>Selenomonas</i>	1,31	1,21	0,83	0,63	0,61	0,21	0,861
<i>Streptococcus</i>	1,06	0,66	0,31	0,81	0,25	0,13	0,339
<i>Subdoligranulum</i>	3,70	2,57	3,63	2,89	1,98	0,29	0,496
<i>Succnivibrio</i>	1,44	1,80	1,33	0,62	0,55	0,27	0,467

CN – controle negativo, sem adição de aditivo antimicrobiano; CP – dieta controle positivo, com halquinol; EP1 – dieta com 1% de EP; EP2 – dieta com 2% de EP; EP3 – dieta com 3% de EP.

¹ Médias de 10 observações por dieta.

² EPM = Erro Padrão da Média.

³ Efeito linear (P = 0,0101).

^{ab}Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.2.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados dos testes *in vitro* evidenciaram efeitos bacteriostáticos e bactericidas do EP sobre a mesma *E. coli* usada no desafio sanitário, porém em dose superior a testada no experimento *in vivo*, 6% de inclusão do EP, Em contrapartida, ao avaliar a CIM em cepas de *E. coli* U7 a concentração de 3% do EP apresentou efeito bacteriostático.

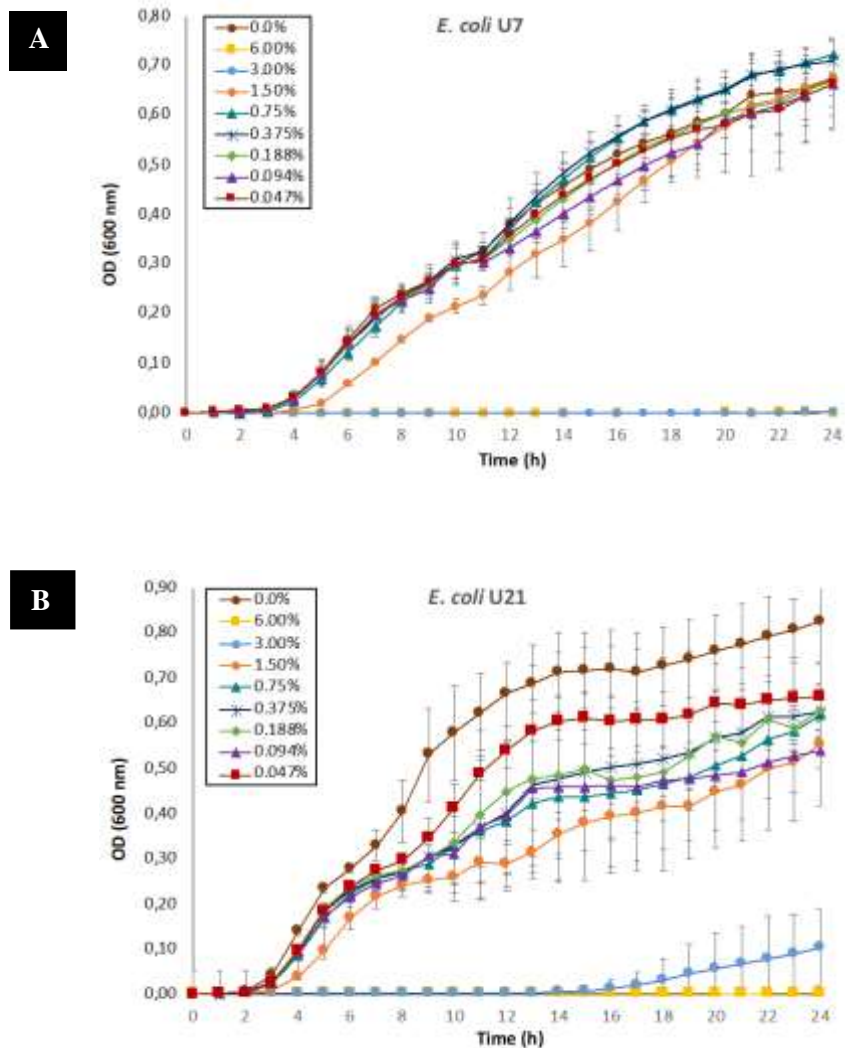


Figura 1: Cinética de crescimento bacteriano em função das concentrações do extrato pirolenhoso a) *E. coli* U21 e b) *E. coli* U7

Tabela 17, Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato pirolenhoso

Cepa bacteriana	Extrato pirolenhoso	
	Concentração Inibitória Mínima (% v/v) ¹	Concentração Bactericida Mínima (% v/v) ¹
<i>Escherichia coli</i> U21	6	6
<i>Escherichia coli</i> U7	3	6

¹Determinado por curvas de sobrevivência e teste de resazurina.

4.3. Discussão

Os antibióticos têm sido usados na produção animal desde sua descoberta para manter a saúde e promover melhorias no desempenho. Entretanto, o risco de bactérias adquirirem resistência a antibióticos específicos e resíduos de antibióticos na carne levou à proibição de antibióticos como promotores de crescimento na União Europeia (UE) desde janeiro de 2006 (Papatsiros et al., 2012). Nos últimos anos, pesquisas foram conduzidas para encontrar aditivos alimentares substituintes aos antibióticos, que têm o potencial de melhorar a saúde intestinal e o desempenho de leitões desmamados (Han & Tracker, 2010, Hosseindoust et al., 2017). Particularmente, após a proibição da utilização de antibióticos na dieta de animais, a suplementação dietética de ZnO na dose farmacológica (2,500 e 3,000 mg Zn / kg) foi amplamente utilizada para melhorar o desempenho e funções gastrointestinais e para reduzir a diarreia em leitões pós-desmame (Han & Tracker, 2010). No entanto, em relação às questões ambientais, muitos países da União Européia (Commission Regulation, 2003) e outros países como a Coreia do Sul ou o Japão adotaram restrições ao uso ZnO.

O presente estudo avaliou o efeito da inclusão de EP em substituição ao antibiótico promotor de crescimento e ZnO, sobre o desempenho, frequência de diarreia, morfologia intestinal, parâmetros do sistema imune (interleucinas (IL) IL-6, IL10 e TNF- α) e sanguíneos e população microbiana no ceco de leitões recém-desmamados sob condições de desafio sanitário. A inoculação dos leitões, por via oral, com cepas de *E. coli* U21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +), foi implementada para criar situação de desafio sanitário, em que o uso de aditivos antimicrobianos e de seus possíveis substitutos fosse necessária para permitir bom desempenho dos animais e, conseqüentemente, possibilitasse visualização dos potenciais efeitos dos aditivos em estudo.

A exposição dos animais ao desafio sanitário com inoculação por *E. coli* U 21 (K88 + / LT + / STb + / F18 + / Sta +) não foi efetiva, uma vez que não se observou o agravamento da diarreia após a inoculação por *E. coli* e a sua permanência até sete dias (Marquardt et al., 1999; Owusu-Asiedu et al, 2003). O desmame é uma prática comercial que engloba vários agentes estressores que, em condições de pesquisas são reduzidos, pois trabalha-se com menor grupo de animais por baia, maior cautela na relação homem-animal, maior controle ambiental e maior atenção a um número reduzido de animais. Tais fatos reduzem os agentes multifatoriais causadores do estresse ao desmame, o que garante ao animal maior resistência a exposição a doses desafiantes de *E. coli* (Gonyou et al., 1986; Bokkers, 2006).

Os principais componentes do EP de *Eucalyptus urogandis* são guaiacol (16,40%), cresol e seus derivados (5,38%), fenol (1,44%), siringol (8,52) e furfural (15,75%). A presença

de altos teores de guaiacol e seus derivados juntamente com os fenóis e furfural podem explicar as atividades antibacteriana e antifúngica do EP. Enquanto que o cresol e seus derivados são usados como anti-séptico local, parasiticida, desinfetante e como anti-séptico intestinal (O'Neil 2013), Furfural (2-furaldeído) é encontrado na pimenta da Jamaica. É um ingrediente aromatizante e pode atuar como fungicida (Abdel-Kahr et al, 2015) e, além disso, possui ação nematicida (Ismail & Mohamed 2007; Crow & Luc 2014).

Vários estudos foram feitos para identificar a composição química do EP, e mais de 200 compostos principais foram identificados em concentrações variáveis. A composição química e a concentração de compostos dependem intrinsecamente da origem do material carbonizado (Pimenta et al., 2000; Nakai et al., 2007; Rakmai 2009; Souza et al., 2012).

Choi et al. (2009) avaliaram o efeito da inclusão de vinagre de madeira de *Quercus acutíssima* (3,99 de ácido acético e 10,89% de ácido propiônico) sobre o desempenho, digestibilidade e microbiota intestinal, comparando diferentes promotores de crescimento (antibiótico, ácido orgânico e vinagre de madeira) adicionados à dieta de leitões pós-desmame. Os autores verificaram que suínos alimentados com vinagre de madeira tiveram melhor desempenho do que aqueles alimentados com ácidos orgânicos. Pode-se especular que o vinagre de madeira pode ter efeitos semelhantes em influenciar o desempenho de suínos devido à presença de diferentes ácidos orgânicos (Sasaki et al., 1999); além disso, o vinagre de madeira tem efeitos antioxidantes (Pszczola, 1995).

Segundo Sasaki et al, (1999) o EP também é denominado como um ácido orgânico natural. Os ácidos orgânicos adicionados às dietas podem manter um baixo pH do conteúdo gástrico e, conseqüentemente, alterar a microbiota intestinal (Thomlison e Lawrence, 1981; Kirhegessner e Roth, 1982; Burnell et al., 1988). Foi relatado que o EP também apresenta forte atividade ácida em pH 3 e contém 280 componentes diferentes, sendo os principais o ácido acético e propiônico (Kim, 1996) e substâncias antioxidantes como compostos fenólicos (Loo et al., 2008).

Dibner e Buttin (2002) sugeriram que o acidificante pode causar um aumento na atividade da enzima digestiva, atividade da fitase microbiana e aumentar a secreção pancreática. Akakabe et al. (2006) também relataram que o vinagre de bambu tem um pH baixo na faixa de 2,5–2,8, que supostamente tem efeito semelhante ao de um acidificante. Portanto, o vinagre de bambu pode atuar de forma semelhante ao acidificante e explicar o aumento da digestibilidade e do desempenho em leitões pós-desmame.

Tendo em vista que a variação da composição química do EP influencia a resposta do organismo animal, a ausência de ácidos orgânicos no EP de *Eucalyptus urograndis* (Araújo et

al., 2017) pode explicar a ausência de resultado significativo para os parâmetros de desempenho, pH no estômago e ceco, digestibilidade de nutrientes e frequência de diarreia.

Outro fator importante a se considerar para a inclusão de EP na dieta é a forma física de inclusão do composto, líquida ou em pó. Mekbungwan et al. (2007) avaliaram os efeitos de uma solução de composto de vinagre de madeira em pó de carvão vegetal em leitões recém desmamados alimentados com farinha de semente de guandu crua como fonte proteica. O composto líquido de vinagre de madeira foi adsorvido em pó de carvão vegetal amorfo (1: 4).

Os autores observaram alterações histológicas intestinais em leitões alimentados com semente de guandu, demonstrando que as características intestinais podem ser atrofiadas pela alimentação com semente de guandu, resultando em redução do desempenho. E concluíram que, a inclusão de vinagre de madeira em pó pode prevenir os efeitos prejudiciais das toxinas dietéticas da semente de guandu na função intestinal. Sendo assim, a inclusão do EP líquido no presente estudo pode explicar a ausência de resultados significativos na integridade do epitélio intestinal e peso dos órgãos de leitões recém-desmamados.

As citocinas avaliadas no presente estudo exercem papéis fundamentais na resposta inflamatória, sendo que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células NK. O TNF- α , também conhecido como caquetina, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, que são abundantes no peritônio e no tecido esplâncnico. A IL-10 inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, sintetizadas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando, assim a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN γ pelas células NK (Zhang & Na, 2007; Curfs et al., 1997).

Ao avaliar os efeitos do vinagre de bambu em pó sobre o desempenho e níveis de expressão de mRNA de IL-10, IL-22 e IL-25 em órgãos imunológicos de leitões desmamados, Huo et al. (2016) observaram que a dosagem de vinagre de bambu em pó a 1,0% pode ser sobredosagem e reduzir anormalmente o nível de expressão de mRNA de IL-10, que então não poderia exercer a função de supressão da inflamação suficientemente e resultar em um aumento da taxa de diarreia.

Em contrapartida, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram a não detecção das citocinas IL-6 e TNF- α que pode ser explicada pela presença da IL-10 no organismo dos leitões recém desmamados. Tal fato indica que tanto o EP, quanto o antibiótico, contribuíram

para manutenção da concentração de IL-10 exercendo, assim, a função de supressão da inflamação, mantendo a capacidade de resposta imunológica dos leitões recém-desmamados.

Ao analisar os parâmetros sanguíneos, hemograma e leucograma, em função dos tratamentos, os valores observados neste estudo se mantiveram dentro de limites fisiológicos normais para suínos (Miller et al., 1961; Tizard, 2014).

Uma estratégia eficiente para atenuar o grau de intensidade da diarreia nutricional pós-desmame é regular a composição nutricional da dieta (Leser et al., 2002; Bedford et al., 2001). Várias abordagens nutricionais para melhorar a transição do desmame e atenuar as doenças entéricas foram pesquisadas nos últimos anos (Pluske et al., 2002; Bauer et al., 2006). As evidências sugerem que intervenções dietéticas específicas, como a inclusão adequada de proteínas (Wu, 2016; Rist et al., 2014), fibras (Mu et al., 2017), amido (Han et al., 2012), equilíbrio eletrolítico (Merchant et al., 2011) e outros constituintes da dieta, podem reduzir os efeitos da diarreia nutricional pós-desmame a partir da modulação da microbiota intestinal.

Um dos constituintes da dieta com potencial para reduzir a diarreia nutricional pós-desmame é o EP (Choi et al., 2009; Wang et al., 2012; Yan et al., 2012; Chu et al., 2013). Segundo Choi et al. (2009) a maior população de *Lactobacillus* no íleo de leitões alimentados com dietas suplementadas com vinagre de madeira pode inibir coliformes patogênicos ao TGI, bloqueando possíveis receptores intestinais desses patógenos ou secretando metabólitos tóxicos contra bactérias gram-negativas. De forma similar, o presente estudo verificou uma maior concentração de *Lactobacillus* ($P < 0,05$) e uma redução numérica das populações das bactérias patogênicas *Campylobacter*, *Clostridium* e *Streptococcus* e *Escherichia coli*.

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são ácido-láticas, do tipo bastonetes, Gram-positivas e não esporuladas com cerca de 80 espécies reconhecidas (Axelsson, 2004), e são empregadas como probióticos em dietas de animais de produção, por exercerem uma série de efeitos positivos ao hospedeiro, tais como: produção de compostos orgânicos, decorrentes da atividade fermentativa, como ácido lático, peróxido de hidrogênio e ácido acético que aumentam a acidez intestinal, e substâncias denominadas bacteriocinas, que auxiliam na destruição de microrganismos indesejáveis inibindo proliferação bacteriana e o dano ao epitélio intestinal (Fooks & Gibson, 2002); estímulo a secreção de mucina pelas células intestinais, contribuindo para o espessamento da barreira intestinal local (Mack, et al., 2003); promoção da lise de proteínas com potencial alergênico no TGI, processo que pode contribuir para a redução da alergenicidade das proteínas, minimizando o risco de alergia alimentar; competição por nutrientes com outros microrganismos, fator primordial no controle de patógenos (Chen & Walker, 2005).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, flagelada pertencente à família Enterobacteriaceae e é o agente causador de uma ampla gama de doenças em suínos, incluindo diarreia neonatal e diarreia pós-desmame, que são importantes causas de morte em leitões lactentes e pós-desmame (Fairbrother et al., 2012).

As infecções entéricas por *Clostridium* em suínos ocorrem predominantemente no período neonatal, e as infecções por *Clostridium perfringens* tipo A (Pertencente ao grupo Clostridium 1) são reconhecidas com frequência crescente na indústria suína (Yaeger et al., 2002). *Clostridium perfringens* são bactérias Gram-positivas, anaeróbicas e formadoras de esporos. Os esporos de *Clostridium* podem persistir na matéria fecal e no ambiente, o que pode facilitar a disseminação dessas bactérias e a transmissão da porca para o leitão. A infecção clostridial geralmente ocorre em leitões nos primeiros 7 dias após o nascimento e pode estar associada a uma microbiota normal subdesenvolvida e à administração de antibióticos (Yaeger et al., 2002), A infecção por *Clostridium perfringens* causa diarreia em leitões neonatos, o que pode levar a baixo peso ao desmame, mortalidade pré-desmame e impacto econômico na produção de suínos.

O *Streptococcus suis* é um importante patógeno suíno responsável por grandes perdas econômicas para a indústria suína global (Gottschalk, 2011). O *Streptococcus suis* foi isolado de casos de meningite, broncopneumonia, artrite, pericardite, endocardite, polisserorite, septicemia, rinite e aborto (Perch et al., 1983; Sihvonen et al., 1988; Touil et al., 1988).

Por fim, ao avaliarem os efeitos do estresse do desmame sobre a microbiota intestinal e seu perfil metabólico em leitões, Li et al., (2018) observaram que Campylobacteraceae e *Campylobacter* também aumentaram após o desmame. O aumento desta espécie bacteriana em leitões desmamados pode ser um dos principais motivos da diarreia pós-desmame,

Sendo assim, pode-se concluir que a inclusão do EP em dietas de leitões pós-desmame favoreceu a maior população de *Lactobacillus* no ceco, inibindo, assim, a proliferação de bactérias patogênicas no trato intestinal. Esses resultados sugerem que os antibióticos não apenas reduzem os microrganismos patogênicos, mas também inibem as bactérias benéficas.

Os resultados dos testes *in vitro* vem ao encontro do efeito positivo sobre os *Lactobacillus* no ensaio *in vivo* e, em conjunto, evidenciam o potencial do EP como aditivo para suínos. Os efeitos bacteriostáticos e bactericida sobre a mesma *E. coli* usada no desafio sanitário, porém em dose superior, 6%, evidenciam que o EP tem ação em inibir crescimento e eliminar *E. coli*, sendo o sucesso neste ponto dependente do ajuste de dosagem. Vale ressaltar a necessidade de pesquisas futuras para obtenção do EP seco, ou com menor teor de umidade, de modo que seja possível sua inclusão em dietas para suínos em concentrações mais elevadas.

4.4. Conclusão

Os resultados do presente estudo evidenciam a efetividade do EP sobre a manutenção da microbiota intestinal, uma vez que foi observado maior concentração do gênero *Lactobacillus* nos animais que receberam a dieta contendo 3% de EP. Além disso, a inclusão de EP não promoveu qualquer prejuízo ao desempenho e à saúde dos animais, evidenciando, assim, que o EP não causa efeitos nocivos aos suínos. Por fim, estudos *in vitro* evidenciaram que a inclusão de 6% de EP exerce efeitos bacteriostáticos e bactericida em cepas de *E. coli*.

Referências

- Abdel-Kahr, M.M., Hamman, M.M.A., El-Mougy, N.S., Abd-Elgawad, M.M.M., 2015. Pesticide alternatives for controlling root and root knot of cucumber under plastic house conditions. *Int. J. Innov. Research Sci.* 4, 25–31.
- Adeola, O., 2001. Digestion and balance techniques in pigs. In: Lewis, A. J.; Southern, L. L. (Eds.) *Swine Nutrition*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 903-906.
- Adeola, O., Cowieson, A.J., 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.* 89, 3189–3218.
- Adriansz, T.D., Rummey, J.M., Bennett, I.J., 2000. Solid phase extraction and subsequent identification by gas-chromatography-mass spectrometry of a germination cue present in smoke water. *Analytical Letters*. 33, 2793- 2804.
- AFIP, 1994. Armed Forces Institute Of Pathology. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington: AFIP, 274.
- Ahn, B.J., Jo, T.S., Cho, S.T., Choi, D.H., Hwang, S.G., Kim, J.M., 2005. Effect of dietary moghotan supplementation on fattening performance, fatty acid composition and meat quality in pigs. *Kor. J. Organ. Agricul.* 13, 401-412.
- Akakabe Y., Tamura Y., Iwamoto S., Takabayashi M., Nyuugaku T., 2006. Volatile organic compounds with characteristic odor in bamboo vinegar. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2797–2799.
- AOAC, 2006. Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis*. 18. ed. Washington: AOAC.
- Araújo, E.S., Pimenta, A.S., Feijó, F.M.C., Castro, R.V.O., Fasciotti, M., Monteiro, T.V.C., Lima, K.M.G., 2017. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. *J. Appl. Microbiol.* 124, 85 - 96, 2017.

- Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. et al. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1-66.
- Barreto, J., 2019. Programa de uso terapêutico e subterapêutico de óleos essenciais em substituição aos antibióticos para suínos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 70.
- Bauer, E., Williams, B.A., Smidt, H., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2006. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. *Nutr. Resear. Rev.* 19, 63–78.
- Bedford, M.R.A.J., 2001. *Microbial Interactions in the Response to Exogenous Enzyme Utilization*, Wallingford, UK, 2001.
- Bokkers, E.A.M., 2006. Effects of interactions between humans and domesticated animals. In: Hassink, J.A.N., Van Dijk, M. (Ed.). *Farming for health*. Dordrecht: Springer Netherlands, 31-41.
- Boudry, G., Péron, V., Le Huérou-Luron, I., Lallès, J.P., Sève, B., 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J. Nutr.* 134, 2256-2262.
- Bruininx, E.M.A.M., Binnendijk, G.P., van der PeetSchwering, C.M.C., Schrama, J.W., den Hartog, L.A., Everts, H., Beynen, A. C., 2002. Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 80:1413-1418.
- Burnell, T.W., Cromwell, G.L., Staly, T.S., 1988. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 66, 1100- 1108.
- Callahan, B. J., Mcmurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature methods*, 13, 581-583.
- Castro, M., 2005. Use of additives on the feeding of monogastric animals. *Cub. J. Agricul. Sci.* 39, 439-447.
- Choi J.Y., Shinde P.L., Kwon I.K., Song Y.H., Chae B.J., 2009. Effect of Wood Vinegar on the Performance, Nutrient Digestibility and Intestinal Microflora in Weanling Pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2, 267-274.

- Chu G.M., Jung C.K., Kim H.Y et al., 2013. Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar as antibiotic alternatives on growth performance, immune responses and fecal microflora population in fattening pigs. *Anim. Sci.* 84, 113–120.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard—Ninth Edition.* CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cromwell, G.L., 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.*, 13, 7–27.
- Crow, W.T., Luc, J.E., 2014. Field efficacy of furfural as a nematicide on turf. *J. Nematol.* 46, 8–11.
- Curfs, J.H., Meis, J.F., Hoogkamp-Korstanje J.A., 1997 A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microbiol. Ver.* 10, 742-780.
- Dibner, J.J., Buttin, P., 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J. Appl. Poult. Res.* 11, 453-463.
- Fairbrother, J.M., Gyles, C.L., 2012. Colibacillosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Disease of Swine*. 10th ed; 723–747.
- Fooks, L.J., Gibson, G.R., 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *Brit. J. Nutr.* 88, 39-49.
- Genovese, K. J., Harvey, R. B., Anderson, R. C., Nisbet, D. J., 2001. Protection of suckling neonatal pigs against infection with an enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing 987P fimbriae by the administration of a bacterial competitive exclusion culture. *Microbial Ecol. Health Dis.* 13, 223-228.
- Gonyou, H.W., Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., 1986. Effects of frequent interactions with humans on growing pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 16, 269-278.
- Gottschalk, M., 2011. Streptococcosis. In: *Diseases of Swine*. Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson G, Zimmerman J (Eds). Wiley Publishers, NJ, USA (In Press).
- Grecco, H. A.T., Amorim, A.B., Saleh, M.A.D., Tse, M.L.P., Telles, F.G., Miassi, G.M., Pimenta, G.M., Berto, D.A., 2018. Evaluation of growth performance and gastro-intestinal

parameters on the response of weaned piglets to dietary organic acids. *Na. Acad. Bras. Cienc.* 90, 401-414.

Guillén, M.D., Manzanos, M.J., 2002. Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chemist.* 79, 283-292.

Han, G.Q., Xiang, Z.T., Yu, B., Chen, D.W., Qi, H.W., Mao, X.B., Chen, H., Mao, Q., Huang, Z.Q., 2012. Effects of diferente starch sources on *Bacillus* spp. in intestinal tract and expression. of intestinal development related genes of weanling piglets,” *Mol. Biol. Rep.* 39, 1869–1876.

Hampson, D.J., Kidder, D.E., 1986. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Res. Vet. Sci.* 40, 24-31.

Huo, Y., Liu, Z., Xuan, H., Lu, C., Yu, L. Bao, W., Zhao, G., 2016. Effects of bamboo vinegar powder on growth performance and Mrna expression levels of interleukin-10, interleukin-22, and interleukin-25 in immune organs of weaned piglets. *Anim. Nutr.* 2, 111-118.

Ismail, A.E., Mohamed, M.M., 2007. Effect of diferente concentrations of furfural as botanical nematicide and the application methods in controlling *Meloidogyne incógnita* and *Rotylenchulus reniformis* infecting. *Pakist. J. Nematol.* 25, 45–52.

Jacela, J.Y., Derouchey, J.M., Tokach, M.D., Goodband R.D., Nelssen, J., Renter, D.G., Dritz, S.S., 2009. Feed additives for swine: fact sheets-carcass modifiers, carbohydrate-degrading enzymes and proteases, and anthelmintics. *J Swine Health Product.* 17, 325–332.

Jacela, J.Y., Derouchey, J.M., Tokach, M.D., Goodband R.D., Nelssen, J., Renter, D.G., Dritz, S.S., 2010 Feed additives for swine: fact sheets-prebiotics and probiotics, and phytonics. *J Swine Health Production.* 18, 132–136.

Jayaraman, B., Nyachoti, C.M., 2017. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Anim. Nutr.* 3, 205-211.

Kim, P. G. 1996. Subacute toxicity study of refined wood vinegar. *Bulletin of Natural Science Youngin University* 1, 35-49.

Kirchegessner, M., Roth, F.X., 1982. Fumaric acid as a feed additive in pig nutrition. *Pig News Inf.* 3, 259.

Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M., Moller, M., 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited,” *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 673–690.

- Leibbrandt, V.D., Ewan, R.C., Speer, V.C., Zimmerman, D.R., 1975. Effect of weaning and age at weaning on baby pig performance. *J. Anim. Sci.* 40, 1077-1080.
- Li, Y., Guo, Y., Wen, Z., Jiang, X., Ma X., Han, X., 2018. Weaning stress perturbs gut microbiome and its metabolic profile in piglets. *Sci Rep.*, 8, 18068.
- Liu, H.W., Tong, J.M., Zhou, D.W., 2011. Utilization of Chinese herbal feed additives in animal production. *Agricul. Sci. China*, 10, 1262–1272.
- Loo, A.Y., Jain, K., Darah, I., 2008. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chem.* 107, 1151-1160.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M. A., 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52, 827-833.
- Marquardt, R.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A., Baidoo S.K., 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 283-288.
- Mcmurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8, 612-617.
- Mekbungwan, A., Yamauchi, K., Sakaida, T., Buwjoom, T., Miller, E.R., Ulrey, D.E., Ackermann, I., Schmidt, D.A., Luecke, R.W., Hoefler, J.A., 1961. Swine hematology from birth to maturity. II. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *J Anim Sci.* 20, 890-897.
- Merchant, H.A., McConnell, E.L., Liu, F., Ramaswamy, C., Kulkarni, R.P., Basit, A.W., Murdan, S., 2011. Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the Guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, 3–10.
- Moeser, A.J., Ryan, K.A., Nighot, P.K., Blikslager, A.T., 2007. Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293, 413-421.
- Mu, C., Zhang, L., He, X., Smidt, H., Zhu, W., 2017. Dietary fibres modulate the composition and activity of butyrateproducing bacteria in the large intestine of suckling piglets, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 110, 687–696.

- Myers, W.D., Ludden, P. A., Nayigihugu, V., Hess, B.W., 2004. A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82, p. 179-183, 2004.
- Nakai, T., Kartal, N., Hata, T., Imamura, Y., 2007. Chemical characterization of pyrolysis liquids of woodbased composites and evaluation of their bio-efficiency. *Build. Environ.* 42, 1236–1241.
- O’neil, M.J., 2013. *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Owusu-Asiedu, A., Nyachoti, C.M., Marquardt, R.R., 2003. 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. *J. Anim. Sci.* 81, 1790-1798.
- Papatsiros, V.G., Billinis, C., 2012. The prophylactic use of acidifiers as antibacterial agents in swine. In *Antimicrobial agents*. Edited by Bobbarala. 295–310.
- Perch, B., Kristjansen, P., Skadhauge, K., Group, R., 1983. streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 74, 69–76.
- Pettigrew, J. E., 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 1. *Anim. Biotechnol.* 17, 207–215.
- Pszczola, D.E. 1995. Tour highlights production and uses of smoke-based flavor. *Food Tech.* 49, 70-74.
- Pimenta, A.S., Bayona, J.M., Garcia, M.T., Solanas, A.M., 2000. Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from *Eucalyptus grandis* wood pyrolysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 169–17.
- Pimenta, A. S., Fasciotti, M., Monteiro, T. V. C., Lima, K. M. G., 2018. Chemical Composition of Pyrolygneous Acid Obtained from *Eucalyptus* GG100 Clone. *Molecules.* 23, 426.
- Pluske, J.R., Pethick, D.W., Hopwood, D.E., Hampson, D.J., 2002. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pig. *Nutr. Res. Rev.* 15, 333–371.
- Rakmai, J., 2009. Chemical determination, antimicrobial and antioxidant activities of Thai wood vinegars. MSc Thesis, Prince of Songkhla University, Songkhla, Thailand.

- Rist, V.T.S., Weiss, E., Sauer, N., Mosenthin, R., Eklund, M., 2014. Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets,” *Anaerobe*. 25, 72–79.
- Robinson, M.D., Mccarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. EdgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26, 139-140.
- Sasaki, K., Tsunekawa, M., Tanaka, S., Fudushima, M., Konno, H., 1999. Effect of natural organic acids on microbially mediated dissolution of pyrite in acidic environments. *Shigen-to-Sozai*. 115, 233-239.
- Shim K.S., Ji, J.R., Na C.S., Park, J.H., 2010. Effect of Pyrolyneous Acid Supplementation on Growth Performance, Blood Parameter, Ammonia Gas Emission and Fatty Acid Composition of Breast Meat in Korean Native Chicken. *Journal Poultry Science*, 37, 207-213.
- Souza, J.B.G., Ré-Poppia, N., Jorge Luiz Raposo, J.L. Jr., 2012. Characterization of pyrolyneous acid used in agriculture by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23, 610-617.
- Sugiharto, S., Lauridsen, C., Jensen, B.B., 2015. Gastrointestinal ecosystem and immunological responses in *E. coli* challenged pigs after weaning fed liquid diets containing whey permeate fermented with different lactic acid bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 207, 278-282.
- Suruanarayana, M.V., Suresh, J., Rajasekhar, M.V., 2012. Organic acids in swine feeding: a review. *Agricul. Sci. Resear. J.* 2, 523–533.
- Thomlison, J. R., Lawrence, T.L.J., 1981. Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: Some field observations. *Vet. Record*. 109, 120-122.
- Tizard, I.R., 2014. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. Elsevier: São Paulo.
- Vente-Spreeuwenberg, M.A.M., Verdonk, J.M.A.J., Beynen, A.C., Verstegen, M.W.A., 2003. Interrelationships between gut morphology and feces consistency in newly weaned piglets. *Anim. Sci.* 77, 85-93.
- Wang H.F., Wang J.L., Zhang W.M., Liu J.X., Dai B., 2012. Effect of bamboo vinegar as an antibiotic alternative on growth performance and fecal bacterial communities of weaned piglets. *Livest. Sci.* 144, 173–180.

- Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, F. (1999) Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 329-335.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A., 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86, 140-148.
- Wu, G., 2016. Dietary protein intake and human health. *Food Func.* 7, 1251–1265.
- Yaeger, M., Funk, N., L. Hoffman, L., 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14, 281-287.
- Yan, L., Kim, I.H., Huh, K. Influence of bamboo vinegar supplementation on growth performance, apparent total tract digestibility, blood characteristics, meat quality, fecal noxious gas content, and fecal microbial concentration in finishing pigs. *Liv. Sci.* 144, 240-246.
- Yang, J., Yang, C., Liang, M., Gao, Z., Wu, Y., Ghuang, L., 2016. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi sinensis*. *Molecules.* 21, 1–10.
- Zhang, J.M., Na, J. 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 45, 27-37.

5. CONCLUSÃO GERAL

O conceito de *One Health* é compreendido pela interligação intrínseca e interdependente entre: a saúde animal, a saúde humana e a saúde ambiental. Na produção de suínos, as discussões sobre o conceito de *One Health* estão centralizadas no uso prudente de antimicrobianos na cadeia produtiva. A restrição ao uso de antibióticos pela União Europeia, bem como, a recente restrição ao uso de óxido de Zinco em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento, em dietas de leitões recém-desmamados, fomenta investimentos globais em pesquisas a fim de desenvolver tecnologias alternativas para reduzir a utilização de antimicrobianos em larga escala.

Dentre as alternativas estudadas, destaca-se os prebióticos cujo mecanismo de ação pode ser alterado por agentes multifatoriais, tais como: grau de pureza e origem dos prebióticos, níveis de inclusão, *status* imunológico do animal, grau de higiene das instalações, manejo, nutrição, associação a outros aditivos. Estudos são necessários para estabelecimento da dosagem ideal, bem como, conhecimento dos agentes capazes de interferir na ação dos prebióticos.

Utilizado em larga escala no setor agrícola, o extrato pirolenhoso (EP) é uma alternativa para controle da microbiota intestinal, garantindo assim, a saúde do hospedeiro. No entanto, estudos são necessários para determinar o nível de inclusão do EP, bem como, a forma de inclusão, tendo em vista que, o extrato em pó ou adsorvido a um veículo se mostrou mais eficaz, quando comparado à sua inclusão na forma líquida.

Por fim, a condução do presente estudo evidencia que a utilização de um único aditivo não foi capaz de reduzir o uso de antimicrobianos em larga escala. Sendo assim, a elaboração de um planejamento estratégico com ações integradas de manejo, sanidade e nutrição se torna uma estratégia promissora para atingir um dos pilares do conceito *One Health* na suinocultura.