



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PEDRO LEON GOMES CAIRO

**POPULAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL E CARACTERÍSTICAS DO EPITÉLIO
ABSORTIVO DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS RECEBENDO DIETAS COM
ÓLEO ESSENCIAL DA AROEIRA-VERMELHA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

ILHÉUS – BAHIA

MAIO DE 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PEDRO LEON GOMES CAIRO

**POPULAÇÃO BACTERIANA INTESTINAL E CARACTERÍSTICAS DO EPITÉLIO
ABSORTIVO DE LEITÕES RECÉM-DESMAMADOS RECEBENDO DIETAS COM
ÓLEO ESSENCIAL DA AROEIRA-VERMELHA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção e Comportamento Animal

Orientador: Prof. Dr. Leandro Batista Costa

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rachel Rezende

ILHÉUS-BAHIA
MAIO DE 2014

C136

Cairo, Pedro Leon Gomes.

População bacteriana intestinal e características do epitélio absorptivo de leitões recém-desmamados recebendo dietas com óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) / Pedro Leon Gomes Cairo. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

vii, 61 f. : il.; anexos.

Orientador: Leandro Batista Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências e apêndices.

1. Suíno – Alimentação e rações. 2. Nutrição animal. 3. Antibióticos na nutrição animal. 4. Microbiologia. I. Título.

CDD 636.4085

DEDICATÓRIA

A Deus, por manter vivo o espírito para lutar até o fim.

Aos meus pais, Wanderley Cairo e Assunção Gomes, pelo apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos, pelo incentivo, apoio e orientação.

Aos meus amigos, pela motivação e alegria.

Ofereço

*Às minhas avós, Maria Angélica Cairo e Maria Silva
Gomes, por tudo que me ensinaram ... Eternas em meu coração.*

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Costa, pela orientação, apoio, paciência e profissionalismo em todos os momentos deste trabalho.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de ingressar no mestrado e desenvolver minhas atividades.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESB, pelo financiamento deste projeto.

À Prof.^a Dr.^a. Rachel P. Rezende, pela co-orientação, apoio, amizade e oportunidade de agregar novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Ivan B. Allaman, pelos ensinamentos e apoio nas análises estatísticas realizadas.

À Prof.^a Dr.^a. Larissa C. do Bomfim Costa, por ceder gentilmente seu laboratório e oferecer apoio nas análises de microscopia.

À Prof.^a Dr.^a. Ana Flávia, por ter cedido sua atenção e o laboratório para as análises de Histologia Intestinal.

A Franz Gois, pela amizade e parceria em todos os momentos do projeto, além dos conselhos e orientações.

A Marconi Bonfim, colega de mestrado que ajudou no projeto e nas análises de microbiologia.

A Maicon Sbardella, que gentilmente cedeu seu tempo para realização das análises de diversidade microbiana.

Às colegas do Centro de Microscopia Eletrônica, Élica e Micheângela, pelos ensinamentos referentes às técnicas de extração de óleos essenciais.

Aos colegas e amigos do Centro de Biotecnologia e Genética, Éric, Tharcilla, Moara, Miguel, Gislane, Christiane, Carol, Robert, Natiele, Thales e Fernanda. E também aos amigos Gabriel Souza, Cláudia dos Anjos e Dayanna Adorno, pelo grande apoio.

A Ivo, funcionário do laboratório de Histopatologia do Hospital Veterinário, pelo grande auxílio na confecção das lâminas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do experimento e parte das primeiras análises laboratoriais.

Ao Prof. Vinícius Cantarelli, por ceder espaço no Núcleo de Estudos em Suinocultura e disponibilizar sua equipe para auxílio durante o experimento.

Ao Prof. Dr. Roberto M. de Oliveira, pela paciência de ensinar e acompanhar as análises microbiológicas.

Aos colegas da UFLA, Hebert Silveira, César A. P. Garbossa e Fernando M. de Carvalho Júnior, pelo apoio e ensinamentos durante o experimento.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Suinocultura, Letícia Gomes de M. Amaral, Carolina D. Fernandes, Letícia M. Rodrigues, Danúbia L. de Barros, Ítalo de O. Lisboa, Leonardo F. da Rocha, Rhuan Fillipe Chaves, Túlio Otávio de A. Lima Neto, Rafael V. Fernandes e Luísa C. Fernandes.

Aos amigos da República “Coice de Mula”, em Lavras, Marcos Sanfelice (Lemão), Cristhiano Barros (Red's), Luan (Índio), Lucas Murakami (Lumbriga), Ítalo Castro (Viagra), Juliano Queiroz (Patropi) e Arthur S. Orsi (Mamute).

A Fabiano e Hélio Rodrigues, funcionários do setor de Suinocultura da UFLA, pela ajuda durante o experimento.

À empresa AgroRosa Ltda, pelo fornecimento dos óleos essenciais da aroeira utilizados no experimento.

À empresa Givaudan do Brasil Ltda, pelo microencapsulamento e análise cromatográfica dos óleos essenciais.

CAIRO, Pedro Leon Gomes. População bacteriana intestinal e características do epitélio absorptivo de leitões recém-desmamados recebendo dietas com óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 2014, 70p. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Ba, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a população bacteriana intestinal e as características do epitélio de absorção de leitões recém-desmamados alimentados com dietas contendo óleo essencial de aroeira-vermelha (OEA) (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Noventa leitões desmamados com 21 dias de idade e $5,6 \pm 0,78$ kg de peso vivo foram utilizados em um experimento de blocos casualizados completos com 5 tratamentos, 6 repetições e três animais por unidade experimental (baia). Os tratamentos estudados foram: (ANT) - dieta basal com 120 mg/kg de clorohidroxiquinolina (halquinol); controle (0) - dieta basal sem adição de antibiótico; 500; 1.000 e 1.500 mg/kg de óleo essencial de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) adicionados à dieta basal. A ração e água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental de 14 dias. Ao final do período experimental, um macho castrado de cada baia foi abatido para avaliação da diversidade microbiana intestinal e da histologia intestinal e. A contagem de bactérias totais no jejuno foi maior ($P < 0,05$) nos animais que receberam as dietas ANT, 0 e 1000 mg/kg do OEA. No ceco, foi maior ($P < 0,05$) com as dietas 0, 500 e 1000 mg/kg do OEA. A contagem de *Lactobacillus* no jejuno foi maior ($P < 0,05$) com 1500 mg/kg do OEA, enquanto que no ceco, foi maior ($P < 0,05$) com 500 mg/kg do OEA. A contagem de enterobactérias no jejuno foi maior ($P < 0,05$) com 500mg/kg do OEA e, no ceco, maior ($P < 0,05$) com 0 (controle negativo). A diversidade microbiana, através das técnicas de PCR/DGGE, evidenciou a presença de comunidades bacterianas distintas entre os tratamentos e de algumas até então incomuns à espécie animal estudada. A densidade de vilosidades (DV) no duodeno dos leitões foi maior ($P < 0,01$) para os que receberam a dieta sem aditivo. No jejuno, a dieta sem aditivo foi semelhante a ANT e 500 mg/kg do OEA. Houve efeito quadrático na MFD(%), em que ($\hat{x}_{\text{máx}}=585,1$ mg/kg de óleo) resultou na maior frequência de diarreia ($\hat{y}_{\text{máx}}=75,29$). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para o desempenho zootécnico e morfometria de órgãos. O OEA altera benéficamente a microbiota intestinal de leitões recém-desmamados, no entanto, tais mudanças dependem da microbiota endógena que está relacionada ao equilíbrio homeostático do hospedeiro e conseqüentemente seu bem-estar.

Palavras-chave: 1. DGGE; 2. Microbiologia; 3. Nutrição; 4. PCR; 5. Suínos

CAIRO, Pedro Leon Gomes. Intestinal bacterial population and characteristics of the absorptive epithelium of weanling pigs fed diets with essential oil of red pepper (*Schinus Terebinthifolius* Raddi). 2014, 70p. (Master of Animal Science) – State University of Santa Cruz, Ilhéus, Ba, Brazil.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the intestinal bacterial population and the characteristics of epithelial absorption of weanling pigs fed diets containing essential oil of red pepper (EORP) (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Ninety piglets weaned at 21 days of age and 5.6 ± 0.78 kg live weight were used in an experiment with a randomized complete block design with five treatments, six replicates and three animals per experimental unit (pen). The treatments were: (ANT) - basal diet with 120 mg / kg clorohidroxiquinolina (halquinol); control (0) - basal diet without added antibiotics; 500; 1,000 and 1,500 mg / kg of essential oil of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the basal diet. The feed and water were provided *ad libitum* throughout the experimental period of 14 days. At the end of the experimental period, one castrated male per pen was slaughtered to intestinal microbial diversity and intestinal histology and. The total bacterial count was higher in the jejunum ($P < 0.05$) in animals fed the diets ANT, 0 and 1000 mg / kg of the EORP. Cecum was higher ($P < 0.05$) with diets 0, 500 and 1000 mg / kg of EORP. The count of *Lactobacillus* jejunum was higher ($P < 0.05$) with 1500 mg / kg of EORP, whereas in the cecum was higher ($P < 0.05$) with 500 mg / kg of OAS. The counts of enterobacteria in the jejunum was higher ($P < 0.05$) with 500 mg / kg of the EORP and the cecum higher ($P < 0.05$) with 0 (negative control). Microbial diversity, through techniques of PCR / DGGE, showed the presence of distinct bacterial communities between treatments and some hitherto unusual animal species studied. The density of villi (DV) in the duodenum of piglets was higher ($P < 0.01$) for those who received the diet without additive. Jejunum, diet without additive was similar to ANT and 500 mg / kg of EORP. A quadratic effect on the MFD (%) wherein ($x^{\wedge} \max = 585.1$ mg / kg oil) resulted in higher incidence of diarrhea ($y^{\wedge} \max = 75.29$). No differences ($P > 0.05$) on growth performance and organ morphology were observed. The EORP beneficially alters the intestinal microbiota of weanling piglets, however, such changes depend on the endogenous microbiota that is related to the homeostatic balance of the host and consequently their welfare.

Keywords: 1.DGGE; 2.Microbiology; 3.Nutrition; 4. *Schinus Terebinthifolius*; 4.Swines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antibióticos melhoradores de desempenho.....	07
2.2 Desmame precoce em leitões	08
2.3 Alternativa aos antibióticos melhoradores de desempenho	09
2.4 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	11
2.5 Aroeirinha (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi)	12

3. CAPÍTULO 2 – O ARTIGO CIENTÍFICO

3.1 Carta de Apresentação	14
3.2 Manuscrito	14
3.2.1 Introdução	15
3.2.2 Material e Métodos	17
3.2.3 Obtenção e composição química do óleo essencial	18
3.2.4 Instalações experimentais, animais e dietas	18
3.2.5 Procedimentos experimentais e análises	19
3.3 Resultados	26
3.4 Discussão	29
3.6 Referências	35

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICES.....	57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Concentrações percentuais dos principais constituintes do óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Tabela 2. Composição percentual e valores calculados da dieta fornecida aos animais no período experimental de 1 a 14 dias.

Tabela 3. Caracterização filogenética da microbiota intestinal de leitões desmamados aos 14 dias em função dos tratamentos a partir do sequenciamento das bandas dos géis de DGGE.

Tabela 4. Contagem microbiana (log UFC/g) do conteúdo do intestino delgado e grosso, altura de vilosidades (AV), profundidade de criptas (PC), relação altura de vilosidade/profundidade de cripta (AV/PC), densidade de vilos (DV), médias de frequência de diarreia (MFD, %), médias de peso vivo inicial (P1), peso vivo aos 14 dias (P14), consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP), conversão alimentar (CA), e pesos relativos (porcentagem do peso vivo) dos órgãos de leitões no período de 1 a 14 dias de experimentação.

Figura 1. Gráfico de Regressão Quadrática da MFD.

Figuras 2 e 3. Eletronmicrografias de varredura do epitélio intestinal do duodeno e jejuno de leitões desmamados.

Figuras 4, 5 e 6. Gel de DGGE, dendograma de similaridade de Dice, diagrama de Venn, análise dos componentes principais (PCA) da comunidade bacteriana do intestino dos leitões, dos *primers* Lac1, Lac3 e V3, respectivamente. Tratamentos; CON = dieta controle, ANT = dieta com antimicrobiano, OEA = dieta com óleo essencial da aroeira-vermelha (1500 mg/kg). Segmentos; JEJ = jejuno e CEC = ceco.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC – Antimicrobianos Melhoradores de desempenho
CA – Conversão Alimentar
CBT – Contagem de Bactérias Totais
CBG – Centro de Biotecnologia e Genética
CDR – Consumo Diário de Rao
CES – Centro Experimental de Suínos
DV – Densidade de Vilosidades
FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations
GDP – Ganho Diário de Peso
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MFD – Média de frequência de diarreia
OEA – leo Essencial de Aroeirinha
OMS – Organizao Mundial de Saúde
UE – União Européia
UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz
UFLA – Universidade Federal de Lavras

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os alimentos de origem animal têm trazido preocupações aos consumidores, cujos motivos indicados se relacionam às formas de produção, sobretudo, aquelas relativas às instalações, alimentação e uso de medicamentos. Diante disso, o mercado tem imposto, cada vez mais, exigências para que os produtores possam se adaptar às demandas da sociedade zelando pela saúde dos animais e também pela saúde humana.

Sabe-se que a utilização dos antibióticos melhoradores de desempenho (APC) é prática comum dentro da suinocultura devido aos seus efeitos positivos já comprovados. Porém, desde 2006, a União Europeia (UE) banuiu os antibióticos dos meios de produção animal como promotores de crescimento. A causa apontada, tanto por consumidores, quanto por produtores era que os resíduos de antibióticos presentes na carcaça dos animais tratados poderiam desencadear efeitos indesejáveis, como, por exemplo, o aparecimento de bactérias resistentes.

Órgãos nacionais, como o Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e internacionais, como o *Codex Alimentarius*, da FAO/OMS, a *European Medical Evaluation Agency* (EMA) da União Europeia e o *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, avaliam constantemente quais os antibióticos ainda são usados mesmo que de forma subterapêutica e preventiva (SANTANA et al., 2011). Diante destas imposições algumas alternativas para a substituição dos APC vêm sendo estudadas através de compostos que estejam de acordo com as normas do mercado e de aceitação por parte dos consumidores.

Considerando a vasta biodiversidade mundial, a escolha por produtos naturais alternativos possui um reconhecimento diferenciado, tornando-se principal alvo das pesquisas. Produtos naturais são associados à saúde e bem-estar dos animais, sendo aceitáveis pela sociedade desde a antiguidade, principalmente, por serem utilizados na medicina alternativa.

No Brasil, algumas espécies nativas se destacam como, por exemplo, a aroeirinha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Essa pertencente à família *Anacardiaceae*, sendo conhecida também como aroeira pimenteira, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira branca, aroeira vermelha ou aroeira mansa (RIBAS et al., 2006). É uma planta originária da América do Sul, principalmente do Brasil, Argentina e Paraguai, destacando-se pela utilização em cosméticos, condimentos alimentícios, produtos farmacêuticos e

fitoterápicos. No Brasil é encontrada principalmente na Mata Atlântica, com utilização tanto no mercado interno quanto na exportação (SILVA e HOLANDA, 2010).

A aroeira vermelha apresenta alguns efeitos *in vitro*, tais como, antimicrobiano (COSTA et al., 2010; FREIRES et al., 2010; SANTOS et al., 2013; TONIAL, 2010); antiúlcera (CARLINI et al., 2008); antifúngico (JOHAN et al., 2010); antioxidante (COSTA et al., 2013); anticancerígeno (QUEIROZ et al., 2013) e anti-inflamatório (FREIRES et al., 2013). Em animais, poucos são os dados encontrados na literatura que utilizam tal planta. Alguns estudos indicam certo potencial, como melhores índices de produção e de superfície absorptiva intestinal de frangos de corte (SILVA et al., 2010). No entanto, em suínos, ainda não há trabalhos publicados que descrevam seu potencial, tornando-se, assim, um aditivo fitogênico a ser explorado dentro da produção animal.

Neste contexto, é necessário realizar pesquisas com a aroeira-vermelha para comprovar seus possíveis efeitos *in vivo* e, diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo estudar a população microbiana intestinal e as características do epitélio absorptivo de leitões recém-desmamados alimentados com dietas acrescidas de clorohidroxiquinolina ou óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antibióticos melhoradores de desempenho

Segundo o MAPA (2013), estudos e investimentos na suinocultura posicionaram o Brasil em quarto lugar no *ranking* de exportação mundial de carne suína. Alguns elementos como sanidade, nutrição, manejo da granja, produção integrada e, principalmente, aprimoramento gerencial dos produtores contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o país em destaque no cenário mundial.

A alimentação é o componente de maior participação no custo de produção exigindo uma atenção especial dos suinocultores e influenciando na escolha cuidadosa dos alimentos, na formulação precisa, na adequada confecção das rações e na correta mistura dos ingredientes (CAPUTI et al., 2011).

A expansão da produção de alimentos de origem animal para consumo humano, nas últimas décadas, deve-se aos avanços na intensificação da produção e estudos com a utilização dos antibióticos melhoradores de desempenho, contribuindo com uma produção cada vez mais segura e eficiente. Usados em doses subterapêuticas, eles possuem o intuito de melhorar o desempenho animal de forma profilática e, assim, intensificar os resultados da produção. No entanto, sua utilização de forma indiscriminada pode acarretar resistência microbiana, sendo esta a principal justificativa do banimento de todos os APC da União Europeia (UE), embasadas por razões de interesse público que posteriormente passaram pelo legislativo (regulamentação EC/1831/2003), (ADJIRI-AWERE; VAN LUNEN, 2005; BAKER, 2006).

Segundo Dinis (2010), depois da proibição do uso de APC na produção animal, a suinocultura se deparou com uma série de distúrbios que antes estavam suprimidos, principalmente por estarem relacionados ao trato gastrointestinal, como as doenças entéricas. Apesar de serem amplamente estudados e utilizados na produção de suínos, os antibióticos não possuem mecanismos de ação totalmente elucidados, pois existem evidências de que eles possam vir a diminuir a população de algumas espécies bacterianas específicas ou restringir suas atividades metabólicas no trato gastrointestinal (ANDERSON et al., 1999; CORPET, 2000; DIBNER; RICHARDS, 2005; PAGE, 2006).

Dierick et al. (2002) afirmaram que a promoção de crescimento animal, por antibióticos na ração, está relacionado à inibição de micro-organismos patogênicos no

estômago e no jejuno. Uma redução no crescimento bacteriano no intestino delgado e a diminuição da proliferação dos patógenos são importantes alvos para melhorar o desempenho e a saúde dos animais (APAJALAHTI; KETTUNEN, 2006). Crescentes restrições à utilização dos APC têm solicitado pesquisas para o desenvolvimento de alternativas ao seu uso, destacando: pré, pró, e simbióticos; enzimas; ácidos orgânicos; nucleotídeos, ervas e extratos de plantas medicinais. Até então, nenhuma das alternativas testadas apresentaram eficiência comprovada como os APC e, em geral, muito dos resultados encontrados são inconsistentes e contraditórios, diferentemente dos já consagrados APC (NIEWOLD, 2007).

2.2 Desmame precoce em leitões

O desmame precoce dentro da suinocultura é uma ferramenta necessária durante um ciclo de produção, exercendo influência na maior quantidade de leitões produzidos em uma granja, fazendo com que as matrizes possam entrar em cio mais cedo. No entanto, o desmame requer cuidados, devido ao estresse que os animais passam ao serem separados das matrizes e misturados com outros lotes e devido a mudança radical na dieta realizada precocemente. Essas mudanças podem causar distúrbios gastrintestinais e aumentar a susceptibilidade dos leitões a infecções, reduzindo o desempenho zootécnico, podendo resultar na síndrome de diarreia pós-desmame (SDPD).

De acordo com Burrin e Stoll (2003) o estresse é dividido em fase crítica e fase adaptativa. A fase crítica é observada entre cinco a sete dias pós-desmame. Nesta fase, ocorre a primeira mudança na alimentação dos leitões. A dieta constituída de leite materno é substituída para uma dieta à base de ingredientes sólidos, pouco palatáveis e menos digestíveis. Essa mudança pode causar alterações na mucosa intestinal caracterizadas pelo encurtamento das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e maior *turnover* dos enterócitos, ocorrendo diminuição da atividade das enzimas localizadas na borda em escova dos enterócitos. Após a fase crítica ocorre a fase adaptativa que consiste em uma resposta por ganho compensatório dos animais, principalmente por adequações do sistema imune com o novo ambiente e melhores índices de desempenho (consumo, ganho de peso e conversão alimentar) (HEO et al., 2013; SMITH et al., 2010).

Os distúrbios intestinais podem estar relacionados à expressão de genes responsáveis pela atividade enzimática digestiva e de citocinas inflamatórias que causam a limitação da função da barreira intestinal. Isso promove o aumento na permeabilidade da barreira

intestinal, facilitando a passagem de bactérias, toxinas e antígenos através do epitélio (WIJTEN et al., 2011). Esses genes expressam a regulação do metabolismo duodenal e de funções imunológicas em resposta ao estresse, variando de acordo com o número de dias (1°, 4° e 7°) após o desmame. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares associados com o estresse pós-desmame ainda não estão bem elucidados (TAO e XU, 2013). Contudo, a investigação do uso de alguns aditivos para estimular o desenvolvimento intestinal de suínos se torna necessária, sendo importante compreender os mecanismos auxiliares ao avaliar determinadas propriedades funcionais dos aditivos e ingredientes para alimentos.

Um dos fatores que podem contribuir para manter o intestino saudável é a estabilidade da comunidade bacteriana. A atividade microbiana está também vinculada à regulação da motilidade intestinal, produção de vitaminas, absorção de água, assim como a modulação do sistema imune do intestino (LALLÈS et al., 2007). Embora a maior parte da fermentação ocorra no intestino grosso, alguns estudos demonstram que a microbiota presente no íleo produz uma considerável atividade metabólica (KONSTANTINOV et al., 2006; HTOO et al., 2007).

2.3 Alternativa aos antibióticos melhoradores de desempenho

De acordo com Souza et al. (2003), os alimentos funcionais são caracterizados por possuírem propriedades benéficas e nutricionais básicas com capacidade de auxiliar as funções do organismo contra doenças. Entre os alimentos funcionais destacam-se; o cromo, a betaína, os nucleotídeos, as enzimas e os melhoradores de desempenho (probióticos, prebióticos, simbióticos e fitogênicos) (LIMA et al., 2011). O consumo contínuo destes alimentos pode trazer benefícios específicos à saúde animal, Para isso, é preciso que exerçam efeitos metabólicos ou fisiológicos proporcionando a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, principalmente a partir de quantidades não tóxicas e capazes de melhorar o desempenho dos animais.(BORGES, 2000; CÂNDIDO e CAMPOS 2005).

A utilização de fitogênicos como óleo essencial de tomilho, canela, eucalipto, extrato de gengibre e pimenta podem estimular substâncias envolvidas na digestão como os sais biliares e mucos (PLATEL; SRINIVASAN, 2004). Além disso, atuam no equilíbrio de microorganismos benéficos no lúmen intestinal, promovendo a população de *Lactobacillus* na região ileal e como consequência diminuindo a população de coliformes fecais (CAMARA et al., 2003; WANG et al., 2011).

Os óleos essenciais (OE), que também são referidos como óleos voláteis, são líquidos, oleosos aromáticos, adquiridos a partir de vegetais (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeiras, frutas e raízes) e possuem o reconhecimento de segurança à saúde pelo FDA. Os OE contêm diversas substâncias bioativas como álcoois, fenóis, etanois, terpenos, dentre outros, com atividades antimicrobianas, carcinogênicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antiparasitárias, modulador intestinal e melhorador de crescimento (COSTA et al., 2010; FREITAS et al., 2013; GOÑI et al., 2009; GUARDA et al., 2011; HENN et al., 2010; OUWEHAND et al., 2010; SILVA et al., 2012; UNLU et al., 2010; BALAKRISHNAN et al., 2013; MUELLER et al., 2012; RASHID et al., 2013; SEN et al., 2010; GEORGE et al., 2009; JANCZYK et al., 2008; MICHIELS et al., 2009; HUANG et al., 2010; LI et al., 2012; MAENNER et al., 2011; ZANGERONIMO et al., 2011). Os compostos metabólicos dos óleos essenciais podem melhorar as atividades de enzimas digestivas e a absorção de nutrientes e os valores biológicos de uma dieta de baixa qualidade (WINDISCH et al., 2008). Estudos sugerem que a combinação de diferentes compostos de OE podem ter maior efeito antimicrobiano do que se forem utilizados individualmente, indicando, assim, uma sinergia entre as atividades individuais (BURT, 2004; LEE et al., 2004).

Testes laboratoriais demonstraram que compostos como timol, carvacrol, eugenol e cinamaldeído apresentaram elevada eficácia contra micro-organismos como *Salmonella*, *E.coli* O157, *E.coli* K88 e com pouca inibição para *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em meios que continham a digesta do segmento cecal de suínos (SI et al., 2006). Alguns efeitos de produtos combinados, como alho e canela, demonstram níveis de inibição contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*) (GOÑI et al., 2009).

Com a utilização em leitões desafios com *Salmonella Typhimurium*, combinações como mentol, canola, α -terpenos, di-terpenos, mircenos e limoneno conseguiram melhorar os índices de desempenho e de frequência de diarreia (BRUNO et al., 2013). O timol e cinamaldeído melhoraram o desempenho e reduziram a diarreia de leitões devido ao equilíbrio no *status* imunológico e da microbiota intestinal (LI et al., 2012). A erva-doce, marmeleiro, alfavaca e erva-cidreira controlaram a diarreia (SILVA et al., 2012). No sistema imune, os benefícios do limoneno, eugenol e pineno estão associados ao aumento sérico do IgG, importante para a defesa contra micro-organismos e pela retenção mineralógica de cobre e ferro no fígado, importantes contra anemia (TARANU et al., 2012). Os benefícios da

utilização de compostos fitogênicos estão associados à composição das dietas, condições do ambiente e genótipo dos animais (AHMED et al.,2013; BRUNO et al.,2013; CALDARA et al.,2010; HENN et al., 2010). Contudo, os efeitos podem sofrer alterações, por fatores intrínsecos, ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados a composição e sinergismo das substâncias químicas. Os fatores extrínsecos estão relacionados ao processamento, estresse, armazenamento, tipo de material usado para a extração do óleo e forma de extração (JANG et al., 2004).

2.4 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os óleos essenciais desestabilizam as membranas citoplasmáticas bacterianas, por apresentarem características lipofílicas, permitindo que atravessem a parede celular assim como a membrana citoplasmática bacteriana. Dessa forma afetam a estrutura das camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, aumentando a permeabilidade da membrana (BAKKALI et al., 2008). O crescimento bacteriano então é reduzido com o esgotamento das reservas energéticas pela perda de íons essenciais, podendo causar a morte celular (LAMBERT et al., 2001; ULTEE et al., 2002).

Uma das primeiras aplicações avaliando esses efeitos foram observadas pela ação do timol contra *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. O timol consegue unir-se à membrana por ligações de hidrogênio, alterando suas características de permeabilidade. Além de possuir um mecanismo de ação que causa colapso à integridade citoplasmática bacteriana e nos constituintes intracelulares. A ação do carvacrol, eugenol e cinamaldeído podem ser observada contra *Bacillus cereus*, *E.coli* e *Listeria monocytogenes* considerando a hipótese da interferência iônica na membrana da célula, causando perda de energia, interferindo na pressão osmótica e regulação do pH (GILL e HOLLEY, 2006; JUVEN et al. 1994; ULTEE et al. 2002).

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa a parede celular com característica hidrofílica e podem criar uma barreira à permeabilidade dos óleos essenciais, o que pode explicar a maior resistência dessas a esses aditivos (DORMAN; DEANS, 2000).

Segundo Kalemba e Kunicka (2003), alguns dos fatores que podem influenciar na determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais estão relacionados ao fato de apresentarem baixa solubilidade em água e alta viscosidade, concentração e validade do

inóculo utilizado, condição do meio de cultura (tipo e volume), longos períodos e temperatura de incubação e tipo de solvente ou agente dispersor utilizado.

A principal limitação na utilização dos óleos essenciais é o fato deles serem absorvidos imediatamente quando entram no duodeno (PIVA et al., 2007). Assim, para aumentar e melhorar seu efeito, a técnica de microencapsulação permite que os vários compostos ativos sejam revestidos e protegidos, sendo disponibilizados ao longo do tubo digestório e aumentando sua efetividade no lúmen intestinal (MEUNIER et al., 2006). Diante disso é possível que a absorção seja realizada de forma mais efetiva, considerando a capacidade do trato gastrintestinal de assimilar nutrientes para o crescimento tecidual e produção de energia.

Compostos como *Acanthopanax senticosus*, encontrado em ervas originárias da China, demonstraram promover alterações na densidade da população bacteriana através do aumento de *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus salivarius*, *Bacillus subtilis* e redução de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *E.coli* O157:H7, detectados por meio de técnicas moleculares (PCR/DGGE), assim como redução nos índices de diarreia (FANG et al., 2009).

2.5 Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

A aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma *Anacardiaceae*, nativa do Brasil, conhecida comumente como aroeirinha, aroeira-pimenteira e pimenta-rosa. A variação dos nomes está relacionada aos frutos, quando maduros, possuem aparência de uma pimenta com coloração rosa-avermelhada (LENZ; ORTH, 2004).

A descrição botânica da aroeira-vermelha a enquadra como uma planta arbórea (3,0 a 10,0 m de altura e 10 a 30 cm de diâmetro), folhas lanceoladas, flores brancas e frutos avermelhados. Os produtos são variados e são utilizadas na Europa como condimento substituinte da pimenta preta (*Piper nigrum*), assim como fonte de resina e taninos. Os óleos essenciais das sementes possuem atividade pesticida contra mosca doméstica (*Musca domestica*), cujas propriedades antimicrobianas são constantemente estudadas. Nos Estados Unidos possui importância na apicultura para manutenção das colmeias. Porém, a planta pode causar alergias em pessoas mais sensíveis que entram em contato diretamente com as folhas ou frutos (ORWA et al., 2009). O óleo essencial da aroeira-vermelha passou a ser utilizado pelas indústrias de cosméticos, sendo que em proporções comerciais, seu óleo é produzido

como bem de consumo interno e externo (SILVA e HOLANDA, 2010). Para a produção animal, o interesse é direcionado a estudos que demonstram os princípios ativos produzidos pelo metabolismo secundário da aroeira. Esse metabolismo é um mecanismo natural da planta produzido como defesa contra agentes externos (intemperismo, insetos e outros fatores) e quando há algum tipo de estresse.

Estudos realizados por Barbosa et al. (2007) encontraram no óleo essencial da aroeira uma constituição de monoterpenos de 90%, havendo maior concentração de δ -3-careno (29,22%), α -pineno (12,94%), α -felandreno (13,04%) e β -felandreno (18,08%), embora também tenha sido observada concentração de sesquiterpenos, como o D-germacreno (3,09%). No entanto, essas concentrações podem variar a depender de certos fatores evidenciados, como condições do ambiente, clima, época do ano e partes da planta. A técnica de isolamento de substâncias químicas ainda é recente com a aroeira. Resultados puderam evidenciar efeitos anticancerígenos através do isolamento do princípio ativo α -pineno (MATSUO et al., 2011). Os efeitos benéficos estão associados ao sinergismo e à composição química presente na planta, como efeito antimicrobiano (COSTA et al., 2010; FREIRES et al., 2010; dos SANTOS et al., 2013; TONIAL, 2010); antiúlcera (CARLINI et al., 2008); antifúngica (JOHAN et al., 2010); antioxidante (COSTA et al., 2013); anticancerígena (QUEIROZ et al., 2013) e anti-inflamatória (FREIRES et al., 2013).

As possibilidades de descobertas de produtos naturais oferecidos pela biodiversidade da flora tropical no controle de doenças e em melhores índices de desempenho animal são as razões para que as pesquisas com plantas medicinais nativas continuem a ser desenvolvidas. Além disso, o suíno é um animal ideal para investigar o efeito de componentes dietéticos sobre as comunidades bacterianas e alterações metabólicas, devido as semelhanças em suas necessidades alimentares, anatômicas e fisiológicas do seu sistema digestório com o dos seres humanos. Dessa forma, acredita-se que o conhecimento sobre o óleo essencial da aroeira através de parâmetros que auxiliem na elucidação da amplitude dos seus efeitos torna-se uma alternativa viável.

3. CAPÍTULO 2 – O ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido conforme normas da Revista Plos One – versão para pré-submissão

3.1. Carta de Apresentação

Este trabalho é uma adição valiosa para a literatura científica, pois aborda assuntos relacionados à utilização de um aditivo fitogênico e seus efeitos associados à produção, morfologia, fisiologia e microbiologia animal. Em trabalhos realizados anteriormente com outros aditivos fitogênicos pôde-se observar variação nos resultados com efeitos benéficos ou indiferentes devido a fatores como: quantidade de animais e seu padrão genético, desafios sanitários, composição das dietas, além dos níveis dos produtos testados e suas distintas composições. Este trabalho é um artigo de pesquisa e sua interação com a PLOS está relacionada aos melhoradores de desempenho e seus efeitos à composição e regulação da microbiota intestinal de animais de produção. O editor da academia da PLOS ONE sugerido é; A. Mark Ibekwe, *U. S. Salinity Lab, United States*.

3.2. Manuscrito

Título: População bacteriana intestinal e características do epitélio absorptivo de leitões recém-desmamados recebendo dietas com óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Autores: Pedro Leon Gomes Cairo (P.L.G.Cairo) e Leandro Batista Costa (L.B.Costa).

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a população bacteriana intestinal e as características do epitélio de absorção de leitões recém-desmamados alimentados com dietas contendo óleo essencial de aroeira- vermelha (OEA) (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Noventa leitões desmamados com 21 dias de idade e $5,6 \pm 0,78$ kg de peso vivo foram utilizados em um experimento de blocos casualizados

completos com 5 tratamentos, 6 repetições e três animais por unidade experimental (baia). Os tratamentos estudados foram: (ANT) - dieta basal com 120 mg/kg de clorohidroxiquinolina (halquinol); controle (0) - dieta basal sem adição de antibiótico; 500; 1.000 e 1.500 mg/kg de óleo essencial de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) adicionados à dieta basal. A ração e água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental de 14 dias. Ao final do período experimental, um macho castrado de cada baia foi abatido para avaliação da diversidade microbiana intestinal e da histologia intestinal e. A contagem de bactérias totais no jejuno foi maior ($P < 0,05$) nos animais que receberam as dietas ANT, 0 e 1000 mg/kg do OEA. No ceco, foi maior ($P < 0,05$) com as dietas 0, 500 e 1000 mg/kg do OEA. A contagem de *Lactobacillus* no jejuno foi maior ($P < 0,05$) com 1500 mg/kg do OEA, enquanto que no ceco, foi maior ($P < 0,05$) com 500 mg/kg do OEA. A contagem de enterobactérias no jejuno foi maior ($P < 0,05$) com 500mg/kg do OEA e, no ceco, maior ($P < 0,05$) com 0 (controle negativo). A diversidade microbiana, através das técnicas de PCR/DGGE, evidenciou a presença de comunidades bacterianas distintas entre os tratamentos e de algumas até então incomuns à espécie animal estudada. A densidade de vilosidades (DV) no duodeno dos leitões foi maior ($P < 0,01$) para os que receberam a dieta sem aditivo. No jejuno, a dieta sem aditivo foi semelhante a ANT e 500 mg/kg do OEA. Houve efeito quadrático na MFD(%), em que ($\hat{x}_{\text{máx}} = 585,1$ mg/kg de óleo) resultou na maior frequência de diarreia ($\hat{y}_{\text{máx}} = 75,29$). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para o desempenho zootécnico e morfometria de órgãos. O OEA altera benéficamente a microbiota intestinal de leitões recém-desmamados, no entanto, tais mudanças dependem da microbiota endógena que está relacionada ao equilíbrio homeostático do hospedeiro e conseqüentemente seu bem-estar.

3.2.1. Introdução

Um dos fatores que caracterizam a fase pós-desmame dos leitões é o estresse que passam ao serem separados das matrizes e misturados com outros lotes. Essa fase é conhecida como período crítico, compreendido entre a primeira e segunda semana pós-desmame, onde ocorre uma mudança radical na dieta (líquida para sólida) realizada de forma precoce. Além disso, o contato com bactérias desconhecidas não só resulta em alterações na comunidade microbiana intestinal, mas também, suprimem o sistema imunológico e aumentam a prevalência de patógenos intestinais. Essas mudanças podem causar distúrbios gastrintestinais e aumentar a susceptibilidade dos leitões a infecções, reduzindo o desempenho zootécnico e podendo resultar na síndrome de diarreia pós-desmame (BURRIN e STOLL, 2003).

A microbiota intestinal dos suínos é um ecossistema complexo e dinâmico com diferentes micro-organismos que convivem mutualisticamente, gerando estímulos cruciais para o desenvolvimento do sistema imune e fisiológico. Quando equilibrada, a composição microbiana pode ser considerada essencial para a saúde de um indivíduo, pois distúrbios à comunidade microbiana saudável podem resultar em disfunções no intestino (DETHLEFSEN, et al., 2007). Uma das formas de manter o equilíbrio da microbiota intestinal é através da utilização dos antibióticos, devido à seleção restrita de patógenos que possam causar danos ao hospedeiro. Na fase de creche faz-se importante o uso de melhoradores de desempenho devido ao controle da incidência de diarreia que geralmente é causada por patógenos enterotoxigenéticos como a *E. coli*. (LALLÉS et al., 2007). No entanto, a proibição do uso de antibióticos na produção animal pela União Europeia, bem como restrições por parte dos Estados Unidos, motivados pela possibilidade da resistência de micro-organismos são fatores a serem considerados de grande importância dentro da produção animal. Estes, seriam capazes de transferir geneticamente essa característica para bactérias patogênicas que poderiam vir a ocasionar efeitos desfavoráveis à saúde humana ao consumirem algum produto de origem animal. Outro aspecto está associado à utilização de forma exacerbada desses aditivos, uma vez que devem ser utilizados de forma subterapêutica e preventiva (HUYGHEBAERT et al., 2011).

Tanto as pressões políticas como as de consumo estão levando a uma redução no uso de antibióticos em animais de produção, sendo necessária a busca por alternativas que apresentem benefícios semelhantes antibióticos promotores de crescimento. Dentre as alternativas, o óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) pode vir a ser um fitobiótico em potencial devido as propriedades antimicrobianas (GOMES et al., 2011; FREIRES et al., 2013; MONTARANI et al., 2012) e anti-inflamatórias (MARTORELLI et al., 2011). Esse óleo é comumente utilizado como condimento em diversos países da América

latina e é conhecida mundialmente como: *Bahamian holly*, *Florida holly*, *Christmasberry tree*, *Broadleaf pepper tree*, *Brazilian pepper tree*, *poivrier du Bresil*, *faux poivrie*, *Brasilianischer Pfefferbaum*, *pimienta de Brasil*, *copal* (ORWA et al., 2009).

Recentemente, métodos independentes de cultivo baseados em PCR têm sido utilizados para superar as limitações e preconceitos associados às técnicas baseadas em meios de cultura (HANDELSMAN, 2004). Métodos moleculares mais comumente usados dependem de amplificação do 16S rRNA, como eletroforese desnaturante (DGGE) dos genes 16S rRNA amplificados por PCR (COLLIER et al., 2003; JANCZYK et al., 2009), como o uso de *primers* específicos (AMIT-ROMACH, et al., 2004), ou seqüenciamento de clones 16S rRNA selecionados aleatoriamente (DUMONCEAUX et al., 2006). A amplificação de uma ou mais regiões hipervariáveis da região rRNA 16S seguido por sequenciamento paralelo é agora comumente utilizado para analisar muitas populações bacterianas diferentes (LES DETHLEFSEN et al., 2008; SOGIN et al., 2006).

Considerando a possibilidade prática de adição do óleo na ração, objetivou-se com este experimento estudar a população microbiana intestinal e as características do epitélio absorptivo de leitões recém-desmamados recebendo dietas com óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) através, da contagem e diversidade microbiana intestinal, da frequência de diarreia, da morfologia do epitélio intestinal, do desempenho zootécnico e da morfometria de órgãos.

3.2.2. Material e Métodos

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz), Ilhéus, Bahia; Brasil; número do protocolo: 024/2011.

3.2.3. Obtenção e composição química do óleo essencial da aroeira-vermelha

O óleo essencial de aroeira-vermelha (Tabela 1) foi submetido à análise por meio de um Cromatógrafo a gás (6890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com detector de massas (5973, Agilent Technologies), equipado com uma coluna de sílica DB-5MS (60m x 0,32mm x 1,0 μ m), nas seguintes condições cromatográficas: a temperatura inicial foi de 40°C mantida por 5 minutos e aumentando a temperatura em 4°C, por minuto, até atingir 300°C, permanecendo nessa temperatura por 10 minutos. A composição foi calculada a partir das áreas dos picos dos componentes. A identificação foi confirmada usando compostos padrão disponíveis na biblioteca utilizada (GEN.2013, Givaudan[®]). Devido à volatilidade do óleo essencial foi necessário o microencapsulamento, que foi realizado pela Givaudan do Brasil Ltda, São Paulo - SP, Brasil. Esse método consiste no encapsulamento do óleo essencial para preservação dos seus princípios ativos e das propriedades do óleo. Através do microencapsulamento foi possível, também, minimizar seu sabor na dieta e permitir a liberação do óleo ao longo do trato gastrointestinal dos animais (MEUNIER et al., 2006). As microcápsulas possuíam quantidades iguais do óleo essencial que correspondia a 15% do produto final encapsulado.

3.2.4. Instalações, animais e dietas experimentais

O experimento foi conduzido no Centro Experimental de Suínos (CES) da Universidade Federal de Lavras (UFLA - Departamento de Zootecnia) com duração de 14 dias. A creche experimental possui gaiolas metabólicas suspensas com bandejas de aço colocadas abaixo para coleta das sobras de ração. Cada baía possui uma área de 1,10 x 1,15m² providas de comedouros manuais, bebedouros automáticos tipo chupeta e aquecimento complementar com lâmpada incandescente de 250W. Foram utilizados 90 leitões machos castrados comerciais com peso inicial de 5,65 \pm 0,78kg e peso final de 7,10 \pm 1,0kg e idade

inicial e final de 21 e 35 dias, respectivamente. Os leitões foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados completos com cinco tratamentos, seis repetições por tratamento e três animais por unidade experimental.

Os tratamentos foram: antibiótico (ANT) - dieta basal com 120 mg/kg de clorohidroxiquinolina (halquinol); controle (0) - dieta basal sem adição de antibiótico; 500; 1.000 e 1.500 mg/kg de óleo essencial de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) adicionados à dieta basal. A dieta basal foi formulada para atender às exigências dos leitões, conforme recomendado por Rostagno et al. (2011). As composições percentuais da dieta basal, assim como os valores nutricionais calculados, encontram-se na Tabela 2.

3.2.5. Procedimento experimental e análises

Diversidade Microbiana (Determinação da microbiota intestinal por PCR-DGGE)

Ao final do experimento, um animal de cada unidade experimental foi abatido após jejum de 8 horas. O jejum foi realizado para diminuir a presença de resíduos nos órgãos e facilitar o manuseio dos mesmos. A escolha do animal foi de acordo com o peso vivo sendo utilizado aquele que apresentava o peso mais próximo da média dos animais de cada bloco, independentemente do sexo. Segmentos de cerca de 3 cm de comprimento do jejuno (1,5 m da junção do íleo com o intestino grosso) e ceco foram retirados. Após coleta foram mantidas em frascos vedados e refrigerados em gelo seco e imediatamente enviadas para o Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Ba, Brasil.

Extração do DNA

Foram pesadas cerca de 0,25g do conteúdo dos segmentos intestinais para a extração de DNA com o kit de extração Power Soil[®] DNA isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA,

EUA) seguindo as recomendações do fabricante, com exceção de que foram utilizadas amostras do conteúdo intestinal ao invés de solo. Foi realizado um *pool* (n=6) de cada tratamento (antibiótico - ANT; controle - CON e óleo essencial da aroeira-vermelha - OEA: 1500 mg/kg) em função dos segmentos coletados (jejuno- JEJ e ceco- CEC).

PCR (Cadeia de reação em polimerase)

Para a reação de PCR foi realizada amplificação dos fragmentos de interesse usando iniciadores (*primers*) específicos. Para os micro-organismos de domínio Bactéria da região V3 do rDNA 16S foi utilizado o seguinte conjunto de *primers*: V3 (356 F-GC) 5' CGC CCG CCG CGC GCGGCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GTA CGG GAG GCA GCA G 3' e V3 (518 R) 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3' (IDT[®], San Diego, CA, EUA). Em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) foi realizada a amplificação do DNA da seguinte forma: desnaturação inicial durante 5 min a 95°C; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C durante 1 min; extensão final a 72°C durante 10 min, adaptado de Simpson et al. (2000).

Para bactérias ácido-láticas dois PCRs foram preparados, separadamente, para o Lac 1 e para o Lac 3 utilizando o Lac 2 como *primer* reverso. Para o primeiro grupo de bactérias ácido láticas, o Lac 1 foi utilizado: 5' AGC AGT AGG GAA TCT TCC A. Para o segundo grupo de bactérias ácido láticas o Lac3, foi utilizado: 5' AGC AGT AGG GAA TCT TCG G 3'. Para o *primer* reverso, (Lac2), foi utilizado: GC: 5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG GAT TYC ACC GCT ACA GCT ACA CAT G 3'. (IDT[®], San Diego, CA, EUA). O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) e consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 2 min. seguido de 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 2 min. a 60°C e 1 min. a 72°C e a extensão a 72°C por 30 min, adaptado de Simpson et al. (2000).

Para amplificação de todas as amostras foi utilizada solução mix de 25 µl contendo 0,5µl de dNTP, 0,75µl de MgCl₂, 0,625µl de cada iniciador, 0,13µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA), 2,5µl de tampão de reação 10X e 2µl de DNA. Uma alíquota do produto de PCR (*amplicons*) foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, usando uma cuba horizontal (DiGel, DH12) por 40 min. e o programa “Kodak 1D 3.5” no aparelho Kodak EDAS 290 (Boston, Cambridge, EUA).

Gel de DGGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação)

Os *amplicons* de interesse foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, com gradiente desnaturante variando entre 20 e 60%. O gradiente foi preparado em duas soluções (solução 100% de desnaturação contendo 40% (vol/vol) de formamida e 7M de ureia e solução 0% de desnaturação sem ureia ou formamida). Foi utilizado um molde com placas adaptadas para a produção dos géis. Foram aplicados 25µl do produto de PCR por canaleta. A eletroforese foi realizada por 15 min a 70V e depois por 4 horas a 200V em temperatura de 60°C. Os géis foram fixados por 15 min em solução de ácido acético e etanol, corados com nitrato de prata (0,2%) por 10 min e lavados com água destilada por 1 min. Posteriormente foi adicionado hidróxido de sódio (3,0%) observando o aparecimento das bandas. Uma vez em evidência, foi, então, colocado o carbonato de sódio (1,5%) para desacelerar a reação de coloração evitando o escurecimento do gel. A metodologia foi adaptada de Muyzer e Smalla (1998).

Clonagem

Foi realizada a purificação das bandas através de um kit (Quick PCR Purification Kit), seguindo as normas do fabricante (PureLink™, Löhne, Alemanha). Posteriormente foi utilizado o kit de clonagem TA Cloning[®] (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com

as recomendações técnicas. Por fim, foi realizado teste com células competentes em meio de cultura LB com ampicilina para coletar as colônias de interesse que apresentaram o material genético. Foi realizado um PCR das colônias de interesse utilizando primers M13R (5-CAGGAAACAGCTATGAC-3) e M13F (5-GTAAAACGACGGCCAG-3) e, posteriormente, visualizados em gel de agarose 1% no aparelho Kodak EDAS 290 (Boston, CA, EUA). Após verificação, as amostras foram enviadas para sequenciamento.

Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado na empresa Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada, RS, Brasil) com aparelho ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências de vetores foram obtidas com o programa "vecscreen" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) e, posteriormente, foram comparadas com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta BLASTN específica para genomas bacterianos.

Microbiologia do conteúdo intestinal

Segmentos de cerca de 3 cm de comprimento do duodeno (15 cm do esfíncter estomacal) e jejuno (1,5 m da junção do íleo com o intestino grosso) foram retirados, lavados com solução salina (0,9% NaCl) e fixados em solução formol tamponado (10%) utilizando técnica descrita por Junqueira e Juqueira (1983) com adaptações. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis, identificadas e, em seguida, armazenadas e transportadas, sob refrigeração, para a realização das análises laboratoriais. A contagem de microrganismos foi determinada dentro de 24 horas usando o método convencional de contagem, onde as amostras foram semeadas em meio de cultura (placas

microbiológicas) adequados ao seu crescimento, segundo metodologia descrita por Franklin et al. (2002).

Análise estrutural do epitélio intestinal

Parte das amostras coletadas para a realização das análises de microbiologia do conteúdo intestinal foram destinadas à análise do epitélio intestinal. As amostras foram retiradas imediatamente após o abate para não prejudicar a integridade do epitélio intestinal, sendo posteriormente transportadas para o Laboratório de Histopatologia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus- BA, onde foram emblocadas em parafina e microtomizadas para a montagem das lâminas. Os blocos de parafina contendo as amostras foram cortados em aparelho micrótomo (ANCAP 78, São Paulo - SP, Brasil), sendo realizadas secções e transferidos para as lâminas de vidro. Essas lâminas foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina adaptando a metodologia utilizada por Loddi (1998). As análises micrométricas dos cortes histológicos foram realizadas em um microscópio (Leica DFC295) com aumento de 200 vezes e avaliando, em média, 15 vilosidades e suas respectivas criptas por amostra.

Análise ultraestrutural do epitélio intestinal

Simultaneamente à retirada de amostras para análise estrutural foram retiradas amostras de cerca de 3,0 cm do duodeno e jejuno para análise ultraestrutural. No momento da coleta, as amostras foram lavadas com solução salina (0,9% NaCl), mergulhadas em solução fixadora de Karnovisk por uma hora e após este tempo foram cortadas em fragmentos de 1,5 cm² e armazenados na mesma solução, de acordo com metodologia adaptada de Karnovsky (1965). Posteriormente, no Centro de Microscopia Eletrônica da UESC, as amostras foram cortadas em fragmentos de 0,25cm², feitas lavagens seriadas em tampão fosfato (0,1M, pH

7,2) e fixadas em solução de glutaraldeído, sendo desidratadas, em sequência, em séries crescentes de acetona. Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico (CPD 030, BalTec), montadas em suportes de alumínio (stubs), revestidos com ouro paládio no metalizador (SCD 050, BalTec). Posteriormente, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 250, FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA). Eletronmicografias foram registradas digitalmente e as mais representativas foram gravadas no software (xT Microscope Control Servir), onde as melhores imagens de cada amostra foram escolhidas para análise visual das vilosidades. As mensurações do número de vilos foram feitas em campos distintos de cada amostra. Após verificar a escala da eletronmicografia foi mensurado o campo de observação, a determinação da área e calculada a densidade de vilos (DV) por área (vilos/847.882 μm^2).

Frequência de diarreia

A frequência de diarreia foi analisada diariamente atribuindo notas: 0 e 1 para cada baia de acordo com a consistência das fezes. Para fezes normais (0) e presença de diarreia (1). No final do período experimental foi calculada a porcentagem de dias com diarreia (MFD,%) de cada parcela experimental.

Desempenho Zootécnico

Para a determinação do ganho de peso, os animais foram pesados no início e no final do período experimental. As rações e sobras foram pesadas para a determinação do consumo. De posse destes dados foi calculado o ganho diário de peso (GDP), o consumo diário de ração (CDR) e a conversão alimentar (CA).

Morfometria dos órgãos

Após o abate, a cavidade abdominal foi aberta por incisão longitudinal, retirados e pesados os órgãos (estômago vazio, fígado, vesícula biliar, rins e baço). De posse desses dados foram calculados os pesos relativos dos órgãos considerando o peso vivo dos animais no momento do abate.

Delineamento experimental e análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, com base em um delineamento em blocos casualizados completos. Os resíduos foram testados quanto à normalidade (Lilliefors) e quanto à homocedasticidade de variância, em função dos valores estimados pelo modelo. Quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos foram adotados procedimentos de comparações múltiplas (Teste de Tukey), com exceção da contagem de micro-organismos (*Enterobactérias*), no qual foi feito o teste não-paramétrico de Friedman, devido aos dados não estarem dentro da normalidade, e para a frequência de diarreia, que foi realizado um teste de regressão quadrática para fatores quantitativos. Utilizou-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

Para os dados de diversidade microbiana foram utilizados métodos de análises multivariadas. A análise das bandas foi representada pela sua presença ou ausência em cada tratamento através da matriz de dados, em que a similaridade foi calculada pelo diagrama de Dice (1945). A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para calcular a contribuição de cada variável e gerar uma renderização da amostra de agrupamento de acordo com seu grau de semelhança. O diagrama de Venn foi construído manualmente contendo, no interior das interseções, a quantidade de bandas obtidas pelo gel de DGGE. Os valores foram processados de acordo com a média aritmética de grupos de pares não ponderados (UPGMA) em relação aos tratamentos e segmentos coletados, processados pelo programa Past (Paleontological Statistics) v. 3.01 (HAMMER et al., 2001).

3. 3. Resultados

Efeito da Dieta sobre a Comunidade Microbiana Intestinal

O dendograma do índice de similaridade de Dice, produzido a partir do UPGMA pelo PCR-DGGE, ilustrou a separação dos perfis em *amplicons* que correspondem às dietas utilizadas na alimentação dos leitões. No *primer* Lac1 o óleo expressou um perfil semelhante ao controle na região do jejuno e do ceco de forma predominante na comunidade microbiana, sendo contrário para o antibiótico, que foi bem menos expressivo no ceco e sem expressão no jejuno. O diagrama de Venn do *primer* Lac1 demonstrou esse resultado através da formação de grupos que compartilhavam as UTOs, em que apenas o grupo AJ não pode ser evidenciado no diagrama. A análise dos componentes principais (PCA) pela impressão digital por PCR/DGGE indicaram que as amostras relacionadas ao óleo estiveram mais próximas às do controle, em ambos segmentos. A análise de PCA revelou que o óleo teve um efeito mais proeminente nesse agrupamento de amplicons de espécie de bactéria, diferentemente dos animais que receberam dieta com antibiótico, que foi reduzido (Figura 1).

No *primer* Lac3 pode-se observar que houve baixa expressão dos perfis de comunidades microbianas por parte dos tratamentos com óleo no jejuno e antibiótico no ceco. O diagrama de Venn do *primer* Lac3 demonstrou a formação de três grupos em que dois compartilharam pelo menos uma UTO, presentes nas amostras com antibiótico e com o óleo, sem formação do grupo controle no diagrama. A análise de PCA demonstrou que os grupos formados através do diagrama de Venn são distintos devido a distância existente entre cada amostra. Dessa forma, pode-se afirmar que as dietas testadas tiveram efeitos distintos devido a formação de agrupamento de amplicons de espécies de bactérias, através da impressão digital do PCR/DGGE (Figura 2).

O *primer* V3 demonstrou que o tratamento com óleo e antimicrobiano expressaram forte perfil da comunidade microbiana na região do jejuno e que alguns *amplicons* foram expressados no tratamento com o óleo e com o controle no ceco. O diagrama de Venn do *primer* V3 demonstrou esse resultado através da formação de quatro grupos que compartilharam duas UTOs que estão relacionadas a mesma espécie de lactobacilo encontrado, apesar de alguns grupos terem evidenciado micro-organismos individualmente. A análise dos componentes principais (PCA) pela impressão digital por PCR/DGGE indicaram que as amostras relacionadas aos animais que receberam as dietas com antimicrobianos e óleos, exerceram efeitos semelhantes na região do jejuno pelo agrupamento de amplicons em específico, assim como as amostras relacionadas ao grupo controle no jejuno e antibiótico no ceco (Figura 3).

Determinação do Sequenciamento da Microbiota Intestinal

A Tabela 3 mostra o resultado do sequenciamento. Este foi realizado a partir das bandas mais evidentes resultantes do PCR/DGGE, sendo quatro selecionadas após realização da técnica de clonagem. Com o *primer* Lac1 o resultado do sequenciamento demonstrou que a banda 3 expressou 90% de identidade com a espécie *Lactobacillus pontis* NR_036788 (JX925388). Com o *primer* V3 o resultado do sequenciamento demonstrou que a banda 1 expressou 98% de identidade com a espécie *Rhizobium oryzae* NR_044393 (AB582835), a banda 4 expressou 92% de identidade com a espécie *Prevotella histicola* NR_044407 (GU303863) e a banda 5 expressou 90% de identidade com *Lactobacillus reuteri* NR_075036 (EF123114). Sequências menores não puderam ser obtidas provavelmente porque elas foram relativamente fracas e em estreita proximidade com as outras bandas.

Contagem Microbiana Intestinal, Histologia do Epitélio Intestinal, Frequência de Diarreia, Desempenho Zootécnico e Morfometria de Órgãos

Os dados de contagem microbiana (log UFC/g) do conteúdo do jejuno e ceco, altura de vilosidades (AV), profundidade de criptas (PC), relação altura de vilosidade/profundidade de cripta (AV/PC), densidade de vilos (DV), médias de frequência de diarreia (MFD, %), médias de peso vivo inicial (P1), peso vivo aos 14 dias (P14), consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP), conversão alimentar (CA), e pesos relativos (porcentagem do peso vivo) dos órgãos de leitões no período de 1 a 14 dias de experimentação estão presentes na Tabela 4.

Os animais que receberam o tratamento com antibiótico, no jejuno, apresentaram maior quantidade ($P < 0,05$) de bactérias totais (CBT) em relação aos que receberam 500 e 1500 mg/kg do OEA, enquanto que no ceco, os animais que receberam as dietas controle, 500 e 1000 mg/kg do OEA apresentaram maior quantidade ($P < 0,05$) que os que receberam as dietas ANT e 1500 mg/kg. A quantidade de enterobactérias, no jejuno, foi maior para os animais que receberam 500 mg/kg do OEA em relação aos que receberam os demais tratamentos ($P < 0,05$). No ceco, o tratamento sem aditivos apresentou maior quantidade de enterobactérias ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Em relação a quantidade de *Lactobacillus*, no jejuno, os animais que receberam a dieta com 1500 mg/kg do OEA apresentaram maior quantidade ($P < 0,05$) que os animais dos grupos controle, 500 e 1000 mg/kg do OEA, enquanto que no ceco, os animais que receberam a dieta com 500 mg/kg do OEA apresentaram maior quantidade de *Lactobacillus* ($P < 0,05$) em relação aos animais que receberam os demais tratamentos.

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) para a variável densidade de vilosidades (DV), tanto do duodeno como no jejuno. No duodeno, a DV dos leitões que não receberam aditivos

foi maior ($P<0,05$) do que a dos que receberam os demais tratamentos (ANT, 500, 1000 e 1500). Em relação ao jejuno, os leitões do grupo controle apresentaram valores semelhantes ao dos antibiótico e 500 mg/kg do OEA ($P<0,05$).

O P14, o CDR, o GDP e a CA dos leitões não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tratamentos. Em relação a média da frequência de diarreia (MFD,%) pode-se observar um efeito quadrático através da equação $\hat{y}= 59.96+0.0502x^{\wedge} -0.0000429x^{\wedge 2}$, em que o valor de ($x^{\wedge}_{\text{máx}}=585,1$ mg/kg do óleo) resultou na maior frequência de diarreia ($y^{\wedge}_{\text{máx}}=75,29$), formando uma curva descendente com queda exponencial em 1500mg/kg do OEA (menor frequência de diarreia).

Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P<0,05$) para os pesos relativos (em porcentagem do peso vivo) do estômago vazio, do fígado, da vesícula biliar, dos rins e do baço.

3.4. Discussão

Diversidade microbiana

A diversidade microbiana, através da filogenia, demonstrou algumas espécies de micro-organismos comuns e outras até então pouco detectados ou conhecidos do trato gastrintestinal dos suínos. Espécies de micro-organismos não comuns da microbiota intestinal de leitões, como o *Rhizobium*, pertencente ao grupo de bactérias do gênero *Agrobacterium* foram constatadas por Pedroso et al. (2005) através de sequências de *Bradyrhizobium*, uma bactéria simbiótica de leguminosas. A presença desta bactéria pode ser devido a ingestão do farelo de soja, sendo que estariam aderidas à parede do epitélio no momento da coleta de amostras para análise. Outro micro-organismo encontrado foi de caráter patógeno e até então incomum, a *Prevotella histicola*. Foi constatada como parte da microbiota comensal oral de

seres humanos associados às doenças no jejuno e às infecções observadas em crianças como uma enteropatia mediada pelo sistema imune considerada uma etiologia multifatorial (Downes et al., 2008; Myléus et al., 2012). Contudo, outros micro-organismos encontrados como, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus pontis* são comuns na microbiota de suínos. As populações de *Lactobacillus* spp. são caracterizadas como bactérias ácido lácticas e benéficas aos animais, devido a diminuir relativamente a contagem de outras bactérias, tais como espécies de *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Clostridia* e *Coliformes* (Konstantinov et al., 2004; Hojberg et al., 2005; Metzler-zebeli et al., 2010). Apesar de algumas limitações observadas dentre as técnicas utilizadas, o gel de DGGE pode ser útil para avaliar diferentes comunidades de acordo com o padrão de migração de amostras distinto, indicando que as comunidades microbianas apresentaram diferenças. Isso pode ocorrer devido à subestimação do número de indivíduos associada a não captura de *amplicons* discretos, consequentemente, sem visualização no momento da leitura dos géis (Muyzer e Smalla, 1998).

Contagem microbiana

A inclusão do nível de 1500 mg/kg do óleo essencial da aroeira-vermelha promoveu o aumento na concentração de micro-organismos benéficos como os *lactobacillus* e reduziu o de patógenos, como as enterobactérias, tanto na região do jejuno quanto do ceco. O impacto referente a não utilização de aditivos na dieta dos animais pode ser observado através do grupo controle, em que o número de enterobactérias foi elevado e o de *lactobacillus* menor tanto no jejuno quanto no ceco. Portanto, pode-se afirmar que a microbiota intestinal dos leitões pode ser modificada benéficamente devido às propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias do OEA corroborando com os estudos já realizados *in vitro* (GOMES et al.,2011; MARTORELLI et al.,2011; MONTARANI et al.,2012; SANTOS et al.,2013; TONIAL, 2010). Os dados encontrados nesse trabalho foram semelhantes aos efeitos da

utilização de produtos combinados, como alho e canela, que demonstraram níveis de inibição contra algumas bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* (GOÑI et al., 2009).

Histologia do Epitélio Intestinal

A maior densidade de vilos no duodeno e jejuno neste estudo (Figuras 4 e 5) foi observada no tratamento controle, demonstrando que não houve influência da utilização de aditivos à dieta para esse parâmetro avaliado. Contudo, é importante ressaltar que nem sempre a alta DV implica na melhor absorção de nutrientes, pois podem existir vilos mais maduros que outros ou com maior capacidade de absorção. É comum durante o processo de desmame que ocorram alterações na morfologia intestinal, evidenciadas pela integridade das células epiteliais dos enterócitos. Isso pode ser observado através do encurtamento dos vilos, aumento da profundidade de criptas, e na redução na atividade enzimática do intestino delgado. (Pluske, 2001).

A alteração da dieta líquida para sólida e a exposição à micro-organismos podem provocar alterações nas células epiteliais que comprometam a capacidade absorptiva nutricional, fundamental para o desenvolvimento dos leitões. A inclusão de fitogênicos evidencia uma ação contra micro-organismos patogênicos (efeito antimicrobiano), resultando na diminuição da adesão das bactérias e da produção de toxinas (Windisch et al., 2008). Dessa forma, há maior proteção do epitélio intestinal, aumentando o poder absorptivo e reduzindo a população microbiana, ocasionando menor produção de metabólitos secundários que afeta o pH intestinal necessário para a ação das enzimas digestivas. Assim, o decréscimo da atividade fermentativa da microbiota intestinal, que pode resultar do efeito antimicrobiano dos

fitogênicos, leva a um aumento da disponibilidade de nutrientes essenciais ao animal (Oetting et al., 2006).

Frequencia de diarreia

Em relação a frequência de diarreia pode ser observado que 1500 mg/kg de OEA promoveu uma redução na intensidade da mesma (Figura 6). Esse fator pode estar associado às propriedades farmacológicas da aroeira, como anti-diarreica e anti-inflamatória descritas por Carlini et al. (2010), principalmente a partir dos compostos fenólicos oriundos de suas cascas, frutos, folhas secas e sementes (Ceruks et al., 2007; Lorenzi e Matos, 2002). Diante disso, a dosagem adequada, juntamente com o modo de ação do OEA, pode reduzir os problemas fisiológicos relacionados ao estresse pós-desmame, principalmente no período mais crítico, ou seja, aos 14 dias pós-desmame. Fatores associados a presença de diarreia são observados através das mudanças na histologia do intestino delgado, através da atrofia dos vilos e hiperplasia das criptas em leitões. Isso ocorre devido à alteração das dietas líquidas para dietas sólidas, ricas em proteínas e carboidratos, que necessitam de enzimas específicas e pH ideal para serem absorvidas (Smith et al., 2010). A utilização de compostos como o limoneno, eugenol, pineno timol, cinamaldeído e variados extratos de plantas como erva-doce, marmeleiro, alfavaca e erva-cidreira demonstraram redução nos quadros de diarreia de leitões, podendo estar associado ao equilíbrio no *status* imunológico e da microbiota intestinal (LI et al. 2012; Taranu et al., 2012; Zangerônimo et al., 2011).

Desempenho zootécnico

Em relação ao desempenho zootécnico, o óleo essencial da aroeira vermelha não promoveu efeitos benéficos. Em outros trabalhos que utilizaram misturas de extratos de plantas isso também pode ser constatado (Costa et al., 2011; Bruno et al., 2013). Em

contrapartida, Silva et al. (2010) encontraram que o nível de inclusão de 0,4% do OEA nas dietas de frangos de corte no período de 22 a 47 dias de idade, demonstraram resultados positivos no ganho de peso e no peso final ($P < 0,05$) em relação aos animais que não receberam antimicrobianos. A oscilação dos resultados pode estar associada aos mecanismos de ação dos princípios ativos que podem sofrer variações sazonais, influenciando nas propriedades farmacológicas dos óleos essenciais de aroeira. Montarani et al. (2012) observaram atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do óleo nos meses de março e julho. Foi verificada maior atividade contra cepas bacterianas no mês de julho, atribuindo esse efeito às concentrações existentes no óleo. No mês de julho as concentrações foram de α -pineno (4,2%); β -pineno (0,8%); mirceno (0,8%); α -felandreno (18,2%); *p*-cimeno (3,3%) e limoleno (16,7%), e maior zona de inibição contra *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*. No mês de março as maiores concentrações foram de mirceno (15,4%); cariofileno-E (14,7%) e germacreno-D (8,8%), sem detecção de monoterpênicos e de 5,8% de sesquiterpênicos. Outros aspectos relacionados aos leitões são os distúrbios que ocorrem na fase crítica, das quais geram atividades enzimáticas através da expressão de genes relacionados à citocinas inflamatórias. Assim, debilitam a função da barreira intestinal que é comprometida pelo desenvolvimento de bactérias, toxinas e antígenos, que passam através do epitélio intestinal exercendo efeito mais agravante sobre essa região tecidual na primeira semana do desmame, podendo intervir negativamente nos índices de desempenho (Wijtten, 2011).

Morfometria de órgãos

A adição de fitogênicos na dieta dos leitões pode ser observada através do aumento da digestibilidade dos alimentos, podendo ser explicado não só pela estimulação da atividade enzimática, mas também pela alteração da morfologia e tamanho dos órgãos (Windisch et al., 2008). Nesse estudo, contudo, não pode ser observadas diferenças significativas da inclusão

do óleo essencial da aroeira-vermelha na morfometria de órgãos dos leitões no período crítico. Os dados encontrados nesse estudo foram semelhantes aos encontrados por Costa et al. (2011), os quais, avaliando óleos essenciais e extratos vegetais (óleo essencial de tomilho, canela, eucalipto, *Melaleuca alternifolia*, *Echinaceae angustifolia*, extrato de gengibre e pimenta) na dieta de leitões, também não observaram diferenças para o peso dos órgãos dos leitões. Em contrapartida, Vale et al. (2010), utilizando uma mistura de extratos herbais (tomilho, orégano, alho, anis, estrela de anis (erva doce), ginepro e eucalipto) na dieta de leitões, observaram aumento do peso do fígado com a inclusão de 0,6% da mistura na dieta.

3.7. Referências do Artigo

- Burrin D, Stoll B, (2003) Intestinal nutrient requirements in weanling pigs. In: Pluske JR, Verstegen MWA, Le Dividich H, The weaner pig: Concepts and Consequences. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p.301-335.
- Heo JM et al. (2013) Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.97, n. 2, p. 207–237.
- Gill SR et al. (2006) Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, v. 312, p. 1355–1359.
- Dethlefsen L et al. (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, v.6, p. 280.
- Lallès JP et al. (2007) Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings Of The Nutrition Society*, v.66, p.260-268.
- Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F (2011) An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, v.187, p.182–188.
- FS Gomes et al. (2011) Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, v.114, p. 672-679.
- Freires I. de Almeida et al. (2013) A Randomized Clinical Trial of *Schinus terebinthifolius* Mouthwash to Treat Biofilm-Induced Gingivitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 8 p.
- Martorelli SBF et al. (2011) Anti-inflammatory and healing effects of a 30% hydroalcoholic solution of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) in OralBase: “invivostudy”. *International Journal of Dentistry*, v.10, p.80–90.
- Orwa C et al. (2009) Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 6. Disponível em: <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>. Acessado em 21/02/2014.
- Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology Molecular Biomedical Review*, v.68, p.669–685.
- Collier CT, Smiricky-Tjardes MR, Albin DM, Wubben JE, Gabert VM (2003) Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *Journal of Animal Science*, v. 81, p. 3035–3045.
- Janczyk P, Halle B, Souffrant WB (2009) Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. *Poultry Science*, v. 88, p.2324–2332.

Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z (2004) Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*, v.83, p.1093–1098.

Dumonceaux TJ et al. (2006) Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Applied Environmental Microbiology*, v.72, p.2815–2823.

Les Dethlefsen MMFN, Relman DA (2007) An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, v. 449, p.811–818.

Sogin ML et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A* v.103, p.12115–12120.

Meunier JP et al. (2006) Use of rotary fluidized-bed technology for development of sustained-release plant extracts pellets: Potential application for feed additive additive delivery. *Journal of Animal Science*, v. 84 p. 1850- 1859.

Franklin MA et al. (2002) Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *Journal of Animal Science*, v.80, p.2904–2910.

Simpson JM et al. (2000) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Applied Environmental Microbiology*, v.66, p.4705–4714.

Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.73 p.127–141.

Jukes T, Swick RA (1996) Role of growth promotants in poultry and swine feed. *American Soybean Association. Mita. USA*, v. 195 p.14-24.

Pluske JR (2001) Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig. Pages 1–27 in A Piva, KE Bach Knudsen, and JE Lindberg, ed. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.

Junqueira LCU, Junqueira LMMS (1983) *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: USP, 123p.

Loddi MM (1998) Aspectos produtivos e qualitativos do uso de probiótico para frangos de corte. *Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP*, 60p.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, v.27, p.137-138.

R Development Core Team R (2014) *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <http://www.R-project.org>. Acessado em 10/04/2013.

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, v.26, p.297-302.

Hammer ØHD, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9pp. 24. Palmer M (1993) Putting things in even better order – the advantages of canonical correspondence-analysis. *Ecology*, v.74, p. 2215–2230.

Nakatsu CH (2007) Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society Am Journal*, v.71, p. 562–571.

Pedroso AA et al. (2005) Spacial Variability of Intestinal Bacterial Population of Swine Supplemented with Antimicrobial or Herbal Extracts. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, p.1225–1233.

Zabielski R (2007) Control of the development of the digestive system in newborn mammals (in Polish). *Wyd. PWRiL*, p. 126–147.

Downes J et al. (2008). *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.58, p.1788–1791.

Myléus A et al. (2012) Early infections are associated with increased risk for celiac disease: an incident case- referent study. *BMC Pediatr.*, v.12, p.194.

Konstantinov SR et al. (2004) Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotypes to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, p.3821–3830.

Hojberg O et al. (2005) Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, p.2267–2277.

Metzler-Zebeli BU et al. (2010) Ileal microbiota of growing pigs fed different dietary calcium phosphate levels and phytase content and subjected to ileal pectin infusion. *Journal of Animal Science*, v.88, p.147–158.

Wijten PJ, van der Meulen J, Verstegen MW (2011) Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *British Journal of Nutrition*, v.105, p. 967–981.

Smith MG et al. (2010) Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistance enterotoxinogenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, v.145, p.299-307.

Tucci FM et al. (2011) The effect of the addition of trofic agents in weaned piglet diets over the structure and ultra-structure of small intestine and over performance. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, p.931-940.

Carlini EA et al. (2010) Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão) Revista Brasileira de Farmacognosia, v.20, p.140-146.

Ceruks M et al. (2007) Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Química Nova, v. 20, p. 597-599.

Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A., 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. Journal of Animal Science, v. 86, p.140-148.

Oetting, L.L., Utiyama, C.E., Giani, P.A., Ruiz, U.S., Miyada, V.S., 2006. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. Revista Brasileira de Zootecnia, v.35, p.1389-1397.

Bruno DG et al. (2013) Phytogenic feed additives in piglets challenged with *Salmonella Typhimurium*. Revista Brasileira de Zootecnia, v.42, p.137-143.

Henn JD et al. (2010) Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.1761-1767.

Zangeronimo MG et al. (2011) Herbal extracts and symbiotic mixture replacing antibiotics in piglets at the initial phase. Revista Brasileira de Zootecnia, v.40, p.1045–1051.

Bruno DG et al. (2013) Phytogenic feed additives in piglets challenged with *Salmonella Typhimurium* Revista Brasileira de Zootecnia, v.2, p.137-143.

Silva, M. A. et al. (2010) Óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. Ciência Rural, Santa Maria, v.10, p.2151-2156.

Montanari RM et al. (2012) Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. Molecules, v.17, p.9728-9740.

Marion J et al. (2003) Weaning and feed intake alter pancreatic enzyme activities and corresponding mRNA levels in 7-d-old piglets. Journal Nutrition, v.133, p.362-368.

Costa LB et al. (2011) Aditivos fitogênicos e butirato de sódio como alternativas aos antibióticos para leitões desmamados Arch. Zootecnia, v. 60, n. 231 p.733-744.

Vale P de Azevedo CB do et al. (2010) Óleos Essenciais em Dietas para Leitões Recém-Desmamados. Gl. Sci. Technol., v.3, p.75– 83.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da aroeirinha como substituto de um antibiótico melhorador de desempenho em deitas de leitões recém-desmamados demonstrou eficiência para reduzir a incidência de diarreia, modular a microbiota intestinal, além de possibilitar a identificação filogenética, por meio das técnicas moleculares. No entanto, ainda é necessário maior conhecimento do potencial dos compostos presentes nesse fitogênico para melhor esclarecimento de seus mecanismos de ação para aplicação nos meios de produção.

5. ANEXOS

Tabela 1. Concentrações percentuais dos principais constituintes do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Composto	Concentração (%)
delta-3-carene	41,01
alpha-phellandrene	14,40
Limonene	12,36
alpha-pinene	10,36
beta-pinene	3,89
p-cymene	2,88
Myrcene	2,77
beta-phellandrene	2,42
Sabinense	1,97
Terpinolene	1,14
beta-caryophyllene	0,79
germacrene D	0,62
alpha-elemol	0,44
alpha-thujene	0,43
delta-cadinene	0,43
gamma-terpinene	0,42
Outros	3,67
Total	100,00

Tabela 2. Composição percentual e valores calculados da dieta fornecida aos animais no período experimental de 1 a 14 dias

Ingredientes (%)	Dieta
Farelo de Soja (46%)	31,02
Milho	16,11
Milho gelatinizado	15,00
Farelo de biscoito	20,00
Açúcar	0,21
Dextrina	4,10
Produto lácteo ¹	3,16
Produto lácteo ²	5,00
Fosfato bicálcico	1,88
Sal comum	0,40
NaHCO ₃	0,25
L-Lisina.HCl (78%)	0,55
DL-Metionina (99%)	0,31
L-Treonina (98,5%)	0,20
L-Triptofano (98%)	0,02
Cloreto de colina (60%)	0,10
Premix vitamínico e mineral ³	0,20
Inerte e/ou melhorador de	1,50

desempenho	
Valores calculados (%)	
Energia metabolizável (MJ/kg)	14,57
Proteína Bruta	20,23
Cálcio	0,85
Fósforo total	0,71
Fósforo disponível	0,51
Lisina digestível	1,46
Met+cis digestível	0,83
Triptofano digestível	0,88
Treonina digestível	0,25
Lactose	10,00

¹Prius L72 - Auster Nutrição Animal Ltda.

²Start-pro 20 - Auster Nutrição Animal Ltda.

³Quantidades por kg de ração: 50 mg de manganês; 160 mg de zinco; 246 mg de ferro; 14 mg de cobre; 1,5mg de iodo; 0,36 mg de selênio; 15.000 UI de vitamina A; 3.000 UI de vitamina D3; 110 UI de vitamina E; 5,5 mg de vitamina K3; 4,4 mg de tiamina; 9,2 mg de riboflavina; 6,6 mg de piridoxina; 38 µg de vitamina B12; 1,6 mg de ácido fólico; 27 mg de ácido pantotênico; 44 mg de niacina; 0,14 mg de biotina.

Tabela 3. Caracterização filogenética da microbiota intestinal de leitões desmamados aos 14 dias em função dos tratamentos a partir do sequenciamento das bandas dos géis de DGGE*

Primer	Banda	Organismo (Base de dados)	Organismo (Cultivares)	Identificação (%)	Acesso*
LAC 1	3	<i>Uncultured bacterium</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	90	NR_036788
	1	<i>Uncultured bacterium</i>	<i>Rhizobium oryzae</i>	98	NR_044393
V3	4	<i>Uncultured rumen bacterium</i>	<i>Prevotella histicola</i>	92	NR_044407
	5	<i>Uncultured Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99	NR_075036

*Nomes de micro-organismos de acordo com as sequencias de rDNA pertencentes ao banco de dados do GenBank

Tabela 4. Contagem microbiana (log UFC/g) do conteúdo do jejuno e ceco, altura de vilosidades (AV), profundidade de criptas (PC), relação altura de vilosidade/profundidade de cripta (AV/PC), densidade de vilos (DV), médias de frequência de diarreia (MFD, %), médias de peso vivo inicial (P1), peso vivo aos 14 dias (P14), consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP), conversão alimentar (CA), e pesos relativos (porcentagem do peso vivo) dos órgãos de leitões no período de 1 a 14 dias de experimentação

Variáveis	ANT	Níveis do óleo essencial (mg/kg) ¹				EPM ²	P-value
		0	500	1000	1500		
<i>Contagem microbiana</i>							
<i>Jejuno</i>							
Contagem Bact. Total ³	7,12a	7,03ab	6,87b	7,08ab	6,98b	0,0005	0,049
Enterobactérias ⁴	9,5b	10,00b	15,00a	7,00bc	3,50c	0,24	0,05
<i>Lactobacillus</i> ³	6,92ab	5,67c	6,40bc	6,42bc	7,23a	0,005	0,001
<i>Contagem microbiana</i>							
<i>Ceco</i>							
Contagem Bact. Total ³	9,14b	9,95a	9,90a	9,74a	9,36b	0,001	0,00

Enterobáctérias ⁴	9,50b	14,50a	8,00b	6,50b	6,50b	0,45	0,05
<i>Lactobacillus</i> ³	8,64b	7,97c	8,80a	8,60b	8,59b	0,0001	0,00
<i>Histologia Duodeno</i>							
AV (µm)	206,18	175,65	191,92	208,99	208,25	23,57	0,21
PC (µm)	96,84	93,01	90,84	101,33	106,55	7,94	0,32
AV/PC	2,17	1,99	2,22	2,26	2,10	0,003	0,71
DV ³	52,88b	73,89a	58,22b	57,44b	55,44b	3,68	0,01
<i>Histologia Jejuno</i>							
AV (µm)	215,45	217,95	217,77	224,87	218,39	57,74	0,99
PC (µm)	103,59	94,99	96,49	91,44	99,81	6,46	0,53
AV/PC	2,11	2,23	2,27	2,24	2,18	0,0003	0,40
DV ³	63,67abc	75,22a	73,33ab	60,00bc	57,00c	4,76	0,04
MFD (%) ⁵	53,80	62,67	64,80	76,00	35,20	9,05	0,007
<i>Desempenho</i>							
P1 (kg)	5,64	5,65	5,66	5,65	5,65
P14 (kg)	7,36	6,90	7,10	7,02	7,10	0,01	0,66
CDR (g/dia)	227,68	203,50	195,15	203,62	198,99	64,44	0,17
GDP (g/dia)	131,88	96,07	111,03	123,37	112,09	45,98	0,86
CA	1,81	2,58	1,80	1,95	1,81	0,003	0,20
<i>Morfometria de órgãos</i>							
Estômago vazio(%)	0,73	0,76	0,73	0,77	0,72	0,0002	0,65
Fígado (%)	2,39	2,45	2,27	2,36	2,29	0,001	0,35
Vesícula (%)	0,11	0,12	0,11	0,12	0,10	0,00001	0,54
Rins (%)	0,60	0,67	0,54	0,64	0,61	0,0002	0,93
Baço (%)	0,21	0,20	0,16	0,20	0,21	0,00004	0,33

¹ANT=Antibiótico; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

²Erro Padrão da Média.

³Letras diferentes na linha indicam diferença pelo teste Tukey (P<0,05).

⁴Letras diferentes na linha indicam diferença pelo teste Friedman (P<0,05).

⁵Análise de regressão para fatores quantitativos: Y= -0.0000429x² +0.0502x+59.96 (R²=0.79).

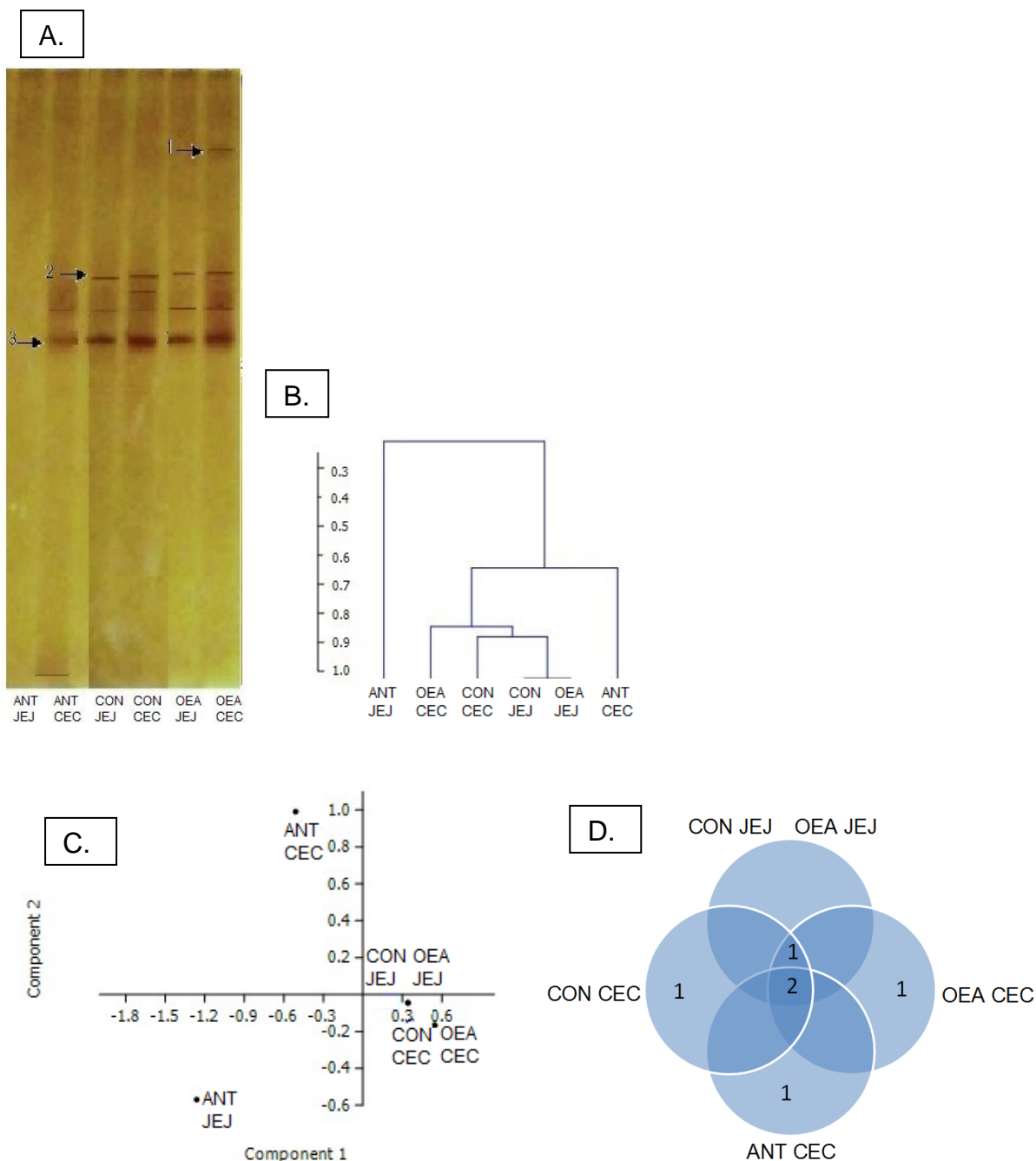


Figura 1. A. Gel de DGGE com as bandas do *primer* Lac1 da microbiota intestinal de leitões. A média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, denominado método da distância média (UPGMA) foi gerado a partir do dendrograma de similaridade de Dice, comparando os genes da região 16S RNAr da impressão do PCR-DGGE. B. Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento das UTOS em função dos tratamentos. Números pertencem aos grupos indicando o número de UTOS por setor. C. Análise dos componentes principais (PCA) da comunidade bacteriana do intestino dos leitões. Tratamentos; CON = dieta controle, ANT = dieta com antibiótico, OEA = dieta com óleo essencial da aroeira (1500mg/kg). Segmentos; JEJ = jejuno e CEC = ceco.

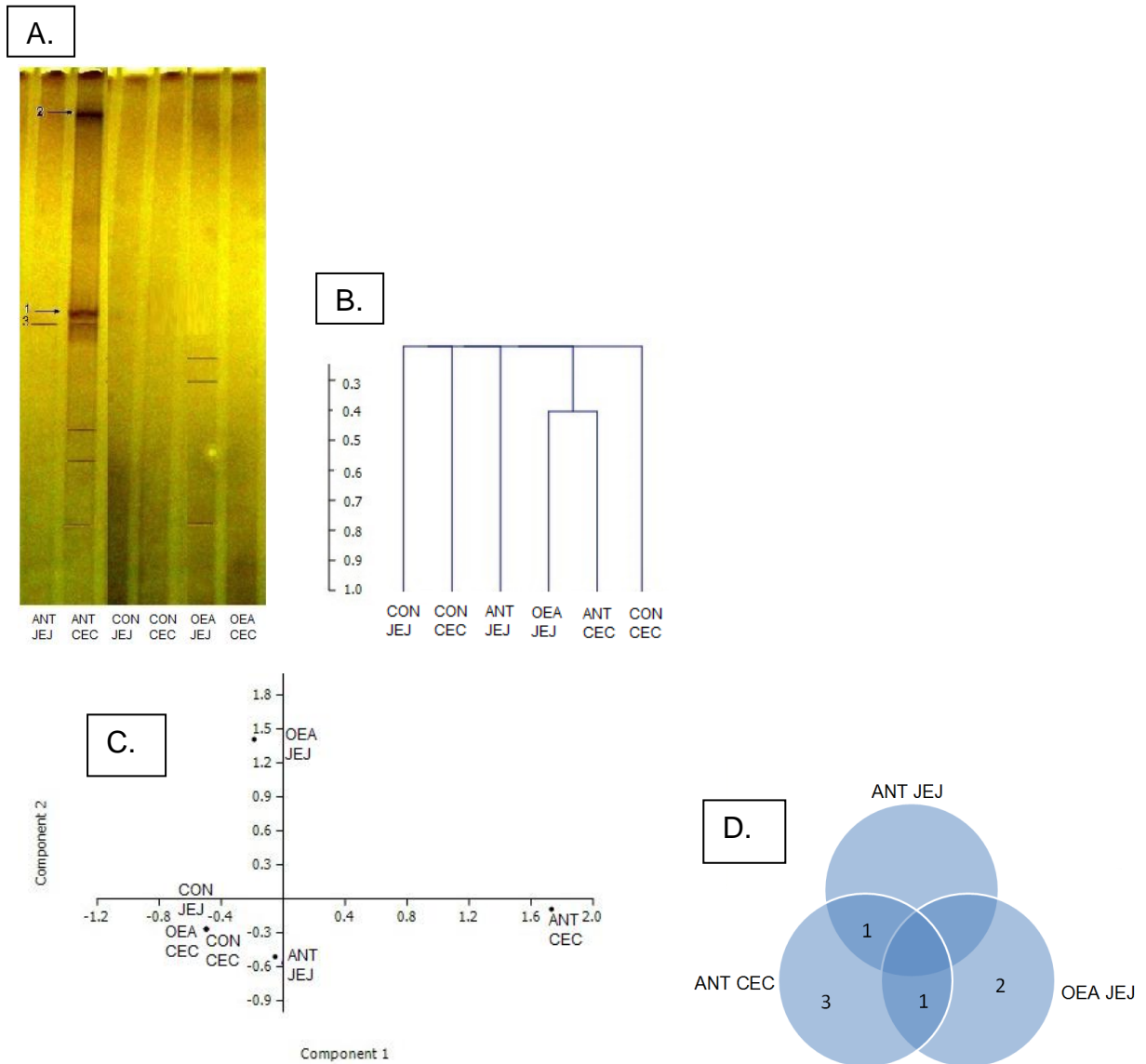


Figura 2. **A.** Gel de DGGE com as bandas do *primer* Lac3 da microbiota intestinal de leitões. **B.** A média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, denominado método da distância média (UPGMA) foi gerado a partir do dendrograma de similaridade de Dice, comparando os genes da região 16S RNAr da impressão do PCR-DGGE. **C.** Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento das UTOS em função dos tratamentos. Números pertencem aos grupos indicando o número de UTOS por setor. **D.** Análise dos componentes principais (PCA) da comunidade bacteriana do intestino dos leitões. Tratamentos; CON = dieta controle, ANT = dieta com antibiótico, OEA = dieta com óleo essencial da aroeira (1500mg/kg). Segmentos; JEJ = jejuno e CEC = ceco.

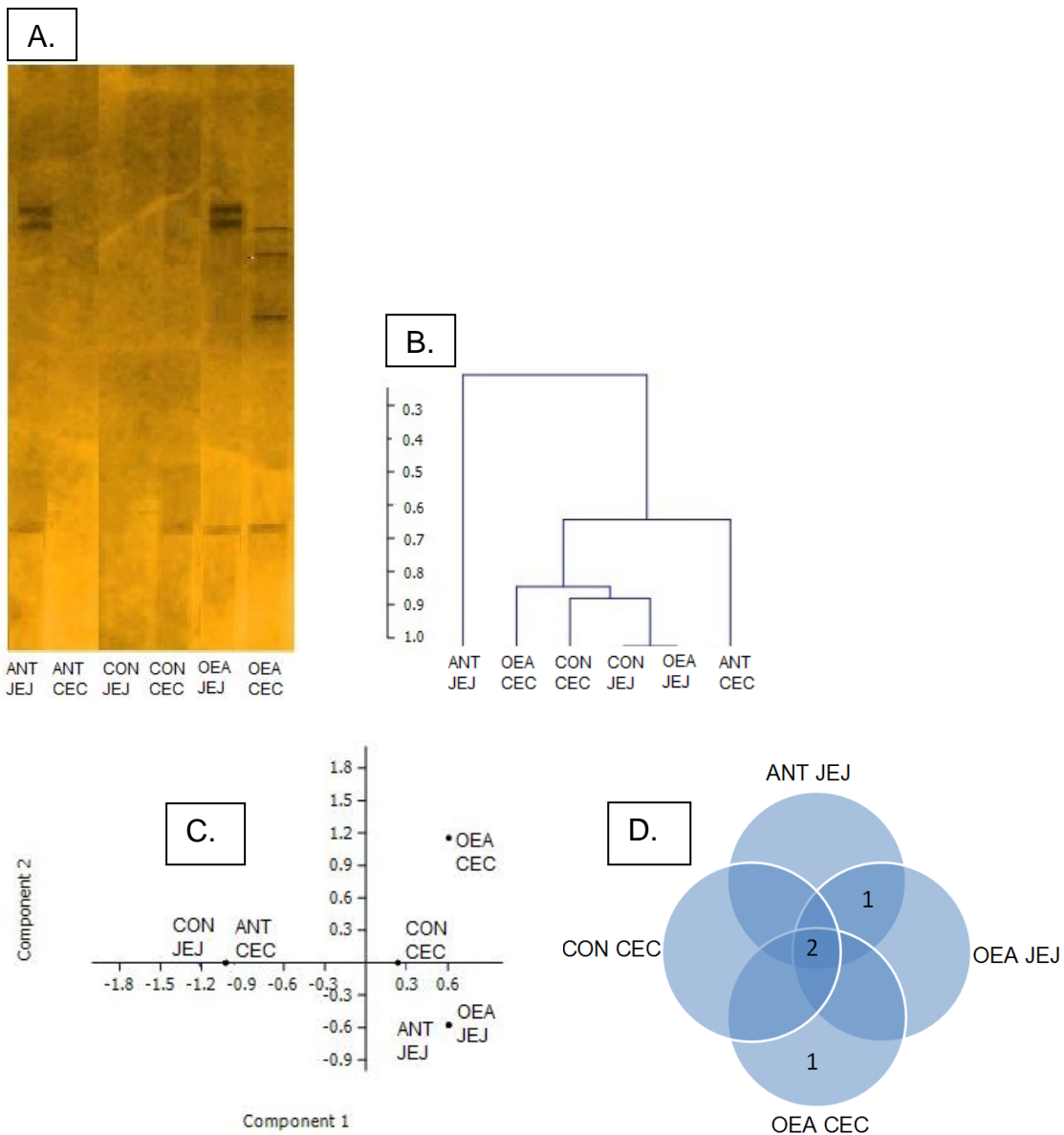


Figura 3. A. Gel de DGGE com as bandas do *primer* V3 da microbiota intestinal de leitões. B. A média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, denominado método da distância média (UPGMA) foi gerado a partir do dendrograma de similaridade de Dice, comparando os genes da região 16S RNAr da impressão do PCR-DGGE. C. Diagrama de Venn ilustrando o compartilhamento das UTOS em função dos tratamentos. Números pertencem aos grupos indicando o número de UTOS por setor. D. Análise dos componentes principais (PCA) da comunidade bacteriana do intestino dos leitões. Tratamentos; CON = dieta controle, ANT = dieta com antibiótico, OEA = dieta com óleo essencial da aroeira (1500mg/kg). Segmentos; JEJ = jejuno e CEC = ceco.

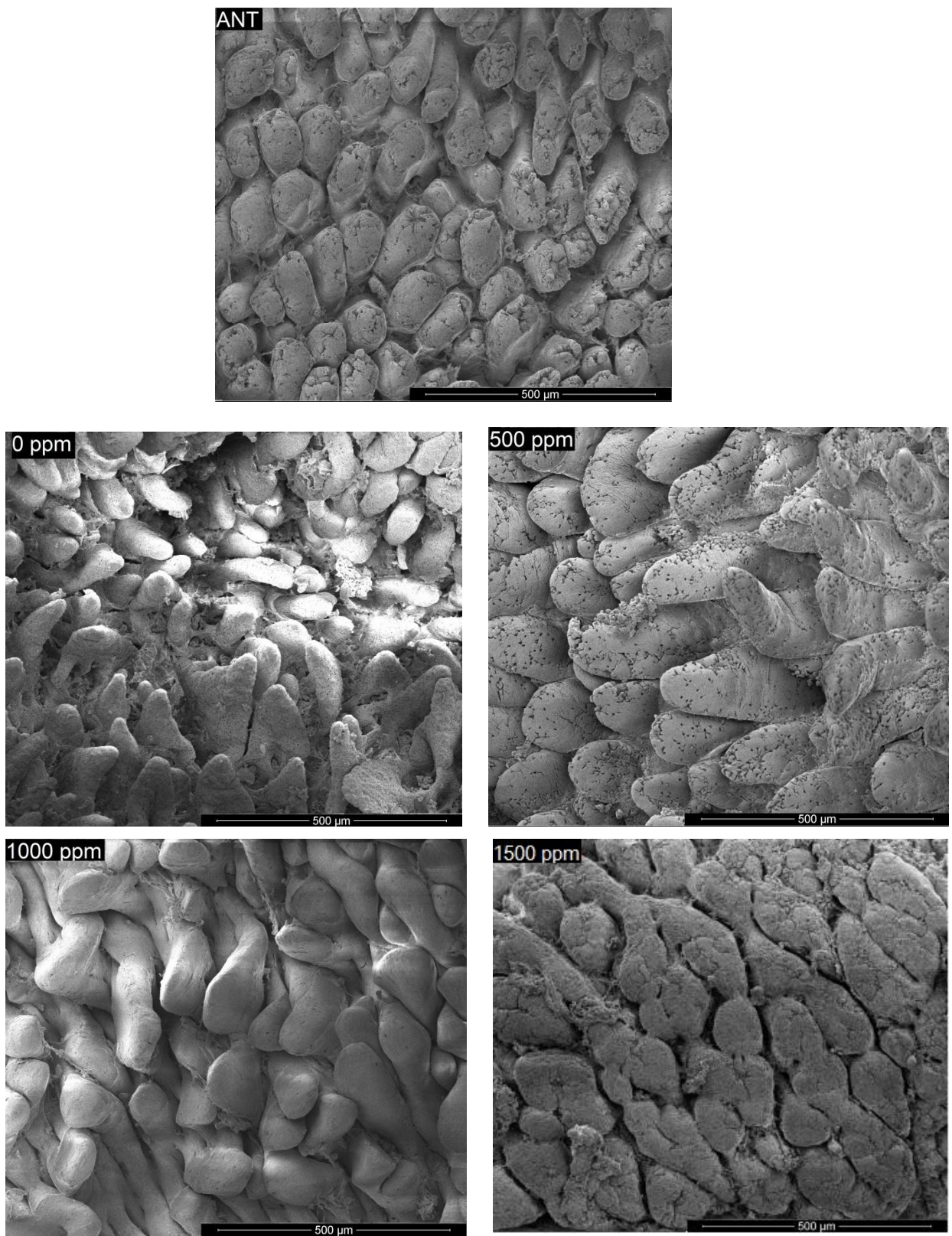


Figura 4. Eletronmicrografia de varredura do duodeno dos leitões dos tratamentos antimicrobiano (ANT), 0, 500, 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

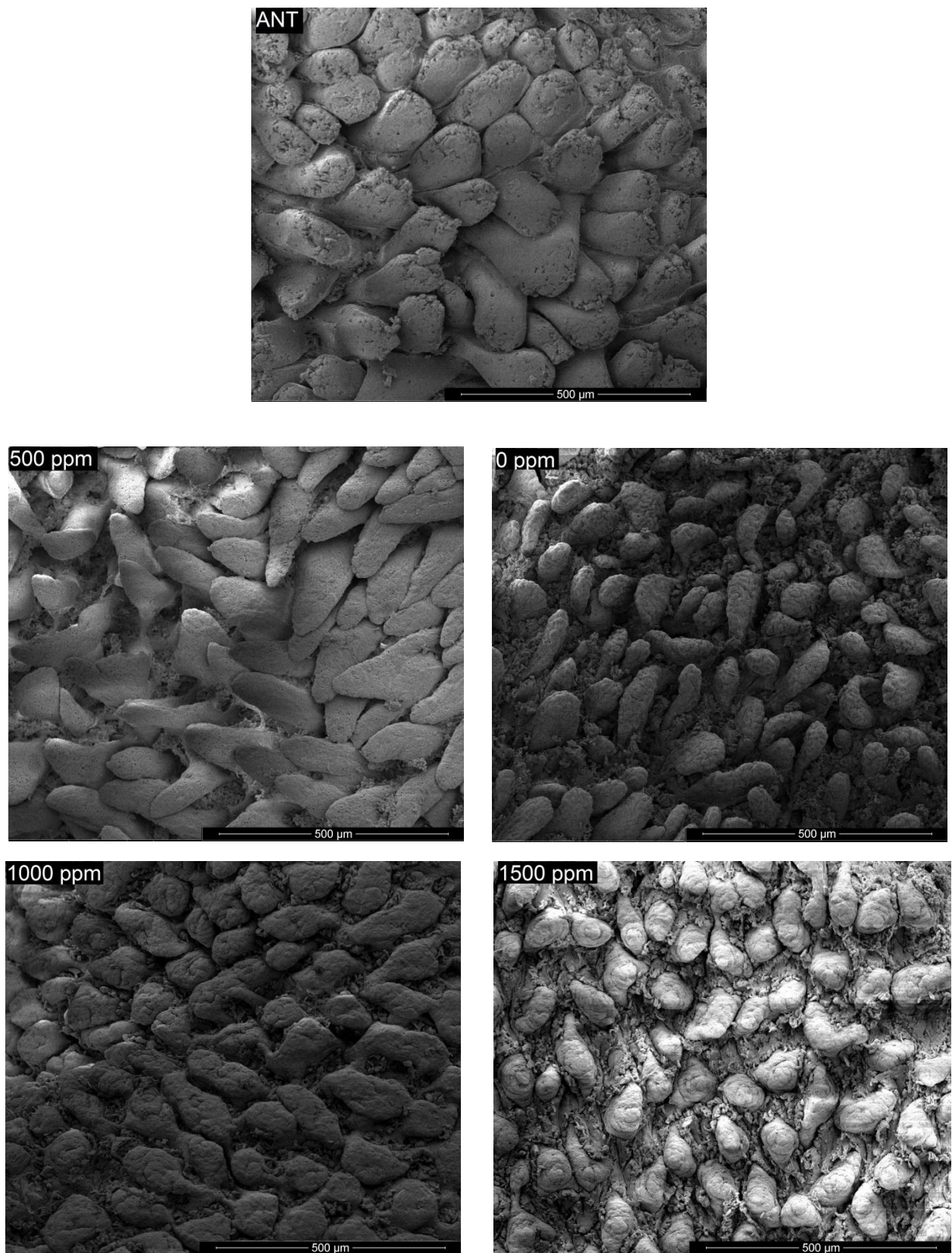


Figura 5. Eletromicrografia de varredura do jejuno dos leitões dos tratamentos antimicrobiano (ANT), 0, 500, 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

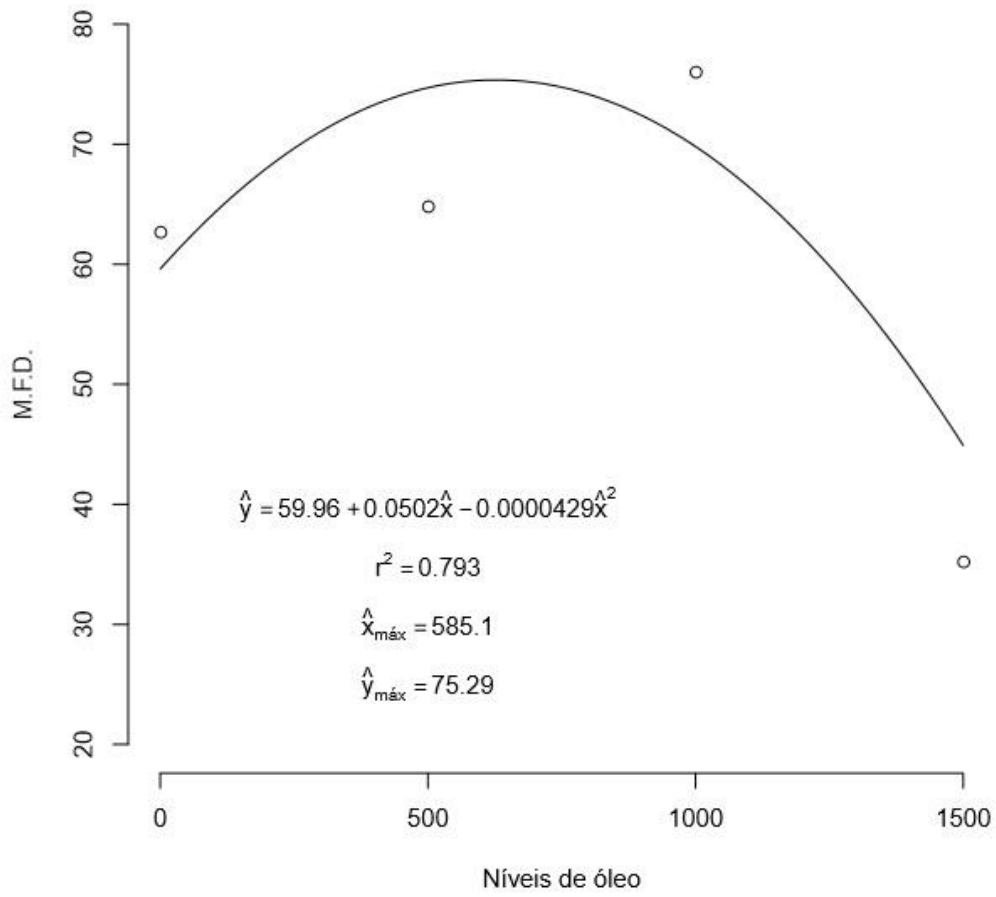


Figura 6. Regressão quadrática para a variável MFD de 1 a 14 dias de idade

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amit-Romach, E.; Sklan, D.: Uni, Z. **Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers.** Poultry Science. v.83, p.1093–1098, 2004.

Adjiri-Awere, A.; T. A. van Lunen. **Subtherapeutic use of antibiotics in pork production: Risks and alternatives.** Canadian Journal of Animal Science. v.85. p. 117-130, 2005.

Ahmed, S. T.; Hossain, M. E.; Kim, G. M.; Hwang, J. A.; Ji, H.; Yang, C. J. **Effects of Resveratrol and Essential Oils on Growth Performance, Immunity, Digestibility and Fecal Microbial Shedding in Challenged Piglets.** Asian Australian Journal of Animal Science. v. 26, n. 5, p. 683-690, 2013.

Anderson, D.B.; McCracken, V. J.; Aminov R. I.; **Gut microbiology and growth promoting antibiotics in swine.** Nutrition Abstracts and Reviews B, vol. 70, p. 101–108, 1999.

Apajalahti, J.; Kettunen, A. **Rational development of novel microbial modulators. In: Barug, D., De Jong, J., Kies, A.K., Verstegen, M.W.A. (Eds), Antimicrobial growth-promoters. Where do we go from here?** Wageningen Academic Publishers, Wageningen, p.165-181, 2006.

Baker R. **Health management with reduced antibiotic use – the U.S. experience.** Animal Biotechnological. v.17 p.195–205, 2006.

Balakrishnan, B.; Ayyavoo, J.; Sadayan, P.; Abimannan, A. **Evaluation of Antioxidant Activity of Clitoria ternatea and Alternanthera sessilis Plant Extracts Using Model System for Yeast Cells.** African Journal of Basic & Applied Sciences. v.3, n.5, p.134-138, 2013.

Bruno, D. G.; Martins, S. M. M. K.; Parazzi, L. J.; Afonso, E. R.; Del Santo, T. A.; Teixeira, S. de Mello N.; Moreno, A. M.; Moretti, A. de Sant'Anna. **Phytogenic feed additives in piglets challenged with Salmonella Typhimurium.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.42, n.2, p.137-143, 2013.

Borges V. C. **Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos.** Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3a ed. São Paulo: Atheneu; p.1495-1509, 2000.

Burrin, D.; Stoll, B.; **Intestinal nutrient requirements in weanling pigs. In: Pluske, J. R.; Verstegen, M. W. A.; Le Dividich, H.; The weaner pig: Concepts and Consequences.** Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p.301-335. 2003.

Burt, S. **Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review.** International Journal of Food Microbiology. v.94, p.223–253, 2004.

Caldara, F. R.; Rosa, P. S. G.; Reis, N. M. de Oliveira; Garcia, R. G.; Paz, I. C. de Lima A.; Almeida, F. A.; dos Santos, V. M. O. F. **Alho e orégano como substitutos de**

antimicrobianos na alimentação de leitões desmamados. Agrarian, v.2, n.5, p.143-152, 2009.

Camara, C. C.; Nascimento, N. R.; Macedo-Filho, C. L.; Almeida, F. B.; Fonteles, M. C. **Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum.** Planta Medicinal. v. 69. p.1080– 1085, 2003.

Caputi, B.; Costa, A. C.; Nogueira, E. T. **Nutrição Responsável: Contribuindo com o meio ambiente - Estratégias para reduzir a excreção e perda de nutrientes em aves e suínos.** Ed 1. Toledo: GFM Gráfica e Editora, São Paulo. 2011, 112p.

Carlini, E. A.; Almeida, J. M. D.; Rodrigues, E.; Tabach, R.; **Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Anacardiaceae* (aroeira-do-sertão)** Revista Brasileira de Farmacognosia. v.2. p.140-146, 2010.

Collier, C. T.; Smiricky-Tjardes, M. R.; Albin, D. M.; Wubben, J. E.; Gabert, V. M.; **Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters.** Journal of Animal Science. v. 81, p. 3035–3045, 2003.

Corpet, D. E. **Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques.** Revue Médicins Vétérinaires, v. 151 n. 2, p. 99-104, 2000.

Costa, C. O. D. S.; Ribeiro, P. R.; de Castro, R. D.; Fernandez, L. G.; **Avaliação da atividade antioxidante em amostras comerciais de *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha)** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, Salvador, v.12, n.3, p.312-317, 2013.

Costa, E. M. M. B. et al. **Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. v. 46. n. 3. p. 175-180. 2010.

Costa, L. B.; Almeida, V. V.; Berenchein, B.; Tse, M.L.P.; Andrade, C.; Miyada, V. S. **Aditivos fitogênicos e butirato de sódio como alternativas aos antibióticos para leitões desmamados** Archivos de Zootecnia, v. 23, n.60 p.733-744, 2011.

Dethlefsen, L.; Huse, S.; Sogin, M. L.; Relman, D. A. **The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing.** PLoS Biology, v.6, p. 280, 2008.

Dibner, J. J.; Richards, J. D. **Antibiotic growth-promoters in agriculture: history and mode of action.** Poultry Science, v.84 n.4 p. 634-643, 2005.

Dierick, N. A., Decuyper, J. A., Molly, K., Van Beek, E. & Vanderbeke, E. **The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets.** Livestock Production Science, v.75 p. 129-142, 2002.

Dinis, J. V. B. M. F. **Estratégias Nutricionais na Prevenção de Doenças Digestivas dos Suínos**. 2010. 146 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa. 2010.

Dumonceaux, T. J.; Hill, J. E.; Hemmingsen, S. M.; Van Kessel, A. G. **Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken**. Applied Environmental Microbiology. v.72, p.2815–2823, 2006.

Fang, J.; Yan, F.G.; Kong, X.F.; Ruan, Z.; Liu, Z.Q.; Huang, R.I.; Li, T.J.; Geng, M.M.; Yang, F.; Zhang, Y.Z.; Peng Li; Joshua Gong; Wu, G.Y.; Fan, M.Z.; Liu, Y.Z.; Hou, Y.Q.; Yin, Y.I. **Dietary supplementantion with *Acanthopanax senticosus* extracts enhances gut health in weanling pigs**. Livestock Science, v.123, p. 268-275, 2009.

Franklin, M. A.; Mathew, A. G.; Vickers, J. R.; Clift, R. A. **Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age**. Journal of Animal Science, v.80, p.2904–2910, 2002.

Freires, I. de Almeida; Alves, L. A.; Jovito, V. De Carvalho.; De Almeida, L. De Fátima.D.; De Castro, R. D.; Padilha, W. W. N.; **Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário**. Odontological Clínica Científic. v.2. p.139-143, 2010.

Freires, I. de Almeida; Alves, L. A.; Ferreira, G. L. S.; Vanessa de Carvalho Jovito, V. de Carvalho.; Castro, R. D.; Cavalcanti, A. L. **A Randomized Clinical Trial of *Schinus terebinthifolius* Mouthwash to Treat Biofilm-Induced Gingivitis**. Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 8 p, 2013.

Freitas, M. A.; 1; Andrade, J. C.; Guedes, G. M. M.; Tintino, S. R.; Souza, C. E. S.; Leite, N. F.; Gondim, C. N. F. L.; Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga, M. F. B.; MATIAS, E. F. F.; Coutinho, H. D. M.; **Evaluation *In Vitro* of Antimicrobial Activity of Carvacrol by the Direct and Gaseous Contact Methods**. Bioscience Journal. Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 781-786, 2013.

George, D. R.; Smith, T. J.; Shiel, R. S.; Sparagano, O. A. E.; Guy, J. H. **Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae***. Veterinary Parasitology. v.161, p.276-282, 2009.

Gill, S. R.; Pop, M.; DeBoy, R. T.; Eckburg, P. B.; Turnbaugh, P. J. **Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome**. Science. v. 312, p. 1355–1359, 2006.

Gill, A. O.; Holley, R. A. **Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics**. International Journal of Food Microbiology, v.2, p.170-174, 2006.

Guarda, A.; Rubilar, J. F.; Miltz, J.; Galotto, M. J.; **The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol**. International Journal of Food Microbiology. v.146. p.144-150, 2011.

Hammer, Ø. H. D.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9pp. 24. Palmer M (1993) **Putting things in even better order – the advantages of canonical correspondence-analysis**. *Ecology* v.74, p. 2215–2230, 2001.

Handelsman, J. **Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms**. *Microbiology Molecular Biomedical Review* v.68, p.669–685, 2004.

Henn, J. D.; Bertol, T. M.; de Moura, N. F.; Coldebella, A.; de Brum, P. A. R.; Casagrande, M. **Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.8, p.1761-1767, 2010.

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

Højberg, O.; Canibe, N.; Poulsen, H. D.; Hedemann, M. S.; Jensen, B. B. **Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets**. *Applied Environmental Microbiology*. v. 71, p.2267–2277, 2005.

Htoo, J. K.; Araiza, B. A.; Sauer, W. C.; Rademacher, M.; Zhang, Y.; Cervantes, M.; Zijlstra, R. T. **Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal, digesta of early-weaned pigs**. *Journal of Animal Science*. v.85. p.3303–3312, 2007.

Huang, Y.; Yoo, J. S.; Kim, H. J.Y.; Wang, Y.; Chen, Y. J.; Cho, J. H.; Kim, I. H. **Effects of Dietary Supplementation with Blended Essential Oils on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Blood Profiles and Fecal Characteristics in Weanling Pigs**. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. v. 23, n. 5, p.607 - 613, 2010.

Huyghebaert, G.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. **An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers**. *Veterinary Journal*, v.187, p.182–188, 2011.

Janczyk, P.; Trevisi, P.; Souffrant, W. B.; Bosi, P. **Effect of thymol on microbial diversity in the porcine jejunum**. *International Journal of Food Microbiology*. v. 126, p. 258-261, 2008.

Janczyk, P.; Halle, B.; Souffrant, W. B. **Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris***. *Poultry Science*, v. 88, p.2324–2332, 2009.

Jang, I. S., Y. H. Ko, H. Y. Yang, J. S. Ha, J. Y. Kim, S. Y. Kang, D. H. Yoo, D. S. Nam, D. H. Kim, and C. Y. Lee. **Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens**. *Asian-australas. Journal of Animal Science*. v.17, p. 394–400, 2004.

Junqueira, L. C. U.; Junqueira, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: USP, 1983. 123p

Jukes, T.; Swick, R. A. **Role of growth promotants in poultry and swine feed.** American Soybean Association. Mita. USA. v.11, n. 195. p. 14-24. 1996.

Juven, B. J.; Kanner, J.; Schved, F.; Weisslowicz, H. **Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents.** Journal of Applied Bacteriology, v.76, p.626-631, 1994.

Karnovsky, M. J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.** The Journal of Cell Biology, v.27, p.137A-138A, 1965.

Konstantinov, S. R.; Awati, A.; Smidt, H.; Williams, B. A.; Akkermans, A. D.; de Vos, W. M. **Specific response of a novel and abundant Lactobacillus amylovorus-like phylotypes to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets.** Applied Environmental Microbiology. v. 70, p.3821–3830, 2004.

Konstantinov, S. R.; Awati, A. A.; Williams, B. A.; Miller, B. G.; Jones, P.; Stokes, C. R.; Akkermans, A. D.; Smidt, H.; de Vos W. M. **Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities.** Environmental Microbiology. v.8. p.1191–1199, 2006.

Lallès, J. P.; Boundry, G.; Favier, C.; Le Floc'h, N. Luron, I.; Montagne, L.; Oswald, I. P.; Pié, S.; Piel, C.; Sève, B.; **Gut function and dysfunction in young pigs: physiology.** Animal Research. v.53, p.301 - 316, 2004.

Lallès, J. P.; Bosi, P.; Smidt, H., Stokes, C. R.; **Nutritional management of gut health in pigs around weaning.** Proceedings Of The Nutrition Society. v.66, p.260-268, 2007.

Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P.; Nychas, G. J. E. **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.** Journal of Applied Microbiology. v.91, p.453–462, 2001.

Les Dethlefsen, M. M. F. N.; Relman, D. A. **An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease.** Nature v. 449, p.811–818, 2007.

Li, P.; Piao, X.; Ru, Y.; Han, X.; Xue, L.; Zhang, H. **Effects of Adding Essential Oil to the Diet of Weaned Pigs on Performance, Nutrient Utilization, Immune Response and Intestinal Health.** Asian-Australian Journal of Animal Science. v. 25, n. 11, p.1617-1626, 2012.

Lima, M. R.; Costa, F. G. P.; Pinheiro, S. G.; da Silva Dantas, L.; Cavalcante, L. E. **Alimentos Funcionais.** Revista Eletrônica Nutritime. v.8, n.5 p.1546- 1557, 2011.

Loddi, M. M. **Aspectos produtivos e qualitativos do uso de probiótico para frangos de corte.** 1998. 60p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 1998.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. v.512 p.2002.

Marion J.; Romé, V.; Savary, G.; Thomas, F.; Le Dividich, J.; Le Huërou- Luron I.; **Weaning and feed intake alter pancreatic enzyme activities and corresponding mRNA levels in 7-d-old piglets.** Journal Nutrition, v.133, p.362-368, 2003.

Matsuo, A. L.; Figueiredo, C. R.; Arruda, D. C.; Pereira, F. V.; Scutti, J. A. B.; Massaoka, M. H.; Travassos, L. R.; Sartorelli, P.; Lago, J. H. G. **α - Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 411, p. 449-454, 2011.

Maenner, K.; Vahjen, W.; Simon, O. **Studies on the effects of essential-oil-based feed additives on performance, ileal nutrient digestibility, and selected bacterial groups in the gastrointestinal tract of piglets.** Journal of Animal Science. v. 89, p. 2106-2112, 2011.

Metzler-Zebeli, B. U.; Vahjen, W.; Baumgartel, T.; Rodehutschord, M.; Mosenthin, R. **Ileal microbiota of growing pigs fed different dietary calcium phosphate levels and phytase content and subjected to ileal pectin infusion.** Journal of Animal Science. v.88, p.147–158, 2010.

Meunier, J. P., et al. **Use of rotary fluidized-bed technology for development of sustained-release plant extracts pellets: Potential application for feed additive additive delivery.** Journal of Animal Science. v. 84 p. 1850- 1859. 2006.

Michiels, J.; J. Missotten, D.; Fremaut, S. De Smet; N. A. Dierick. **In vitro characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora.** Animal Feed Science and Technology. v.151, p.111– 127, 2009.

Mueller, K.; Blum, N. M.; Kluge, H.; Bauerfeind, R.; Froehlich, J.; Mader, A.; Wendler, K. R.; Mueller, A. S. **Effects of broccoli extract and various essential oils on intestinal and faecal microflora and on xenobiotic enzymes and the antioxidant system of piglets.** n.2, v.2, p. 78-98, 2012.

Nakatsu, C. H. **Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis.** Soil Science Society Am Journal. v.71, p. 562–571, 2007.

Niewold, T. A. **The nonantibiotic Anti-inflammatory Effect of Antimicrobial Growth Promoters, The Real Mode of Action? A Hypothesis.** Poultry Science. v.86. p.605- 609, 2007.

Ouwehand, A. C.; Tiihonen, K.; Kettunen, H.; Peuranen, S.; Schulze, H.; Rautonen, N. **In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota.** Veterinarni Medicina v.55. p.71–78, 2010.

Oetting, L.L., Utiyama, C.E., Giani, P.A., Ruiz, U.S., Miyada, V.S. **Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.35, p.1389-1397, 2006.

Page, S. W. **Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: the benefits.** In: Barug, D., De Jong, J., Kies, A.K., Verstegen, M.W.A. (Eds), Antimicrobial growth promoters. Where do we go from here? Wageningen Academic Publishers, Wageningen, p.19-51, 2006.

Platel, K.; Srinivasan, K. **Digestive stimulant action of spices: A myth or reality?** Indian Journal of Medicine Research. v.119. p.167–179, 2004.

Pluske, J. R. ; Kerton, D. J.; Cranwell, P. D. et al. **Age, sex and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs.** Australian Journal Agr. Research, v.54, p.515-527, 2003.

Pluske, J. R. **Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig.** Pages 1–27 in A. Piva, K. E. Bach Knudsen, and J. E. Lindberg, ed. Gut Environment of Pigs. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK, 2001.

Queiroz, L. C.; Crépin, M.; Vacherot, F.; de la Taille, A.; Rodrigues, L. E.; **In Vitro Effects of Polyphenols Extracted from the Aroeira Plant (*Schinus Terebinthifolius Raddi*) on the Growth of Prostate Cancer Cells (Lncap, Pc-3 And Du145).** Brazilian Journal of Medicine and Human Health, Salvador, v.1, n.1, p.71-82, 2013.

Rashid, S.; Rather, M. A.; Shah, W. A.; Bhat, B. A.; **Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd.** Food Chemistry. v. 138, p. 638-700, 2013.

Ribas M.O., Souza M.E, Sartoreto J, Lanzoni TA, Noronha L, Acra LA. **Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato.** Revista Odontológica de Ciências. v.21 n.53. p.245-52, 2006.

Santana, E. S. et al. **Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia. v.7, n.13, p. 985- 1000, 2011.

Santos, A.C.A dos., Rossato M., Agostini F., Dos Santos P.L., Serafini L.A., Moyna P., Dellacassa E.: **Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius Raddi*.** Revista Brasileira de Biociências, v.5, p.1011-1013, 2007.

Silva, T. R. G. da; Martins, T. D. D.; Silva, J. H. V. ; Silva, L. da Paz G. da; Pascoal, L. A. F.; Oliveira, E. R. A. de; Brito, M. S. **Inclusão de óleos essenciais como elementos fitoterápicos na dieta de suínos.** Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., Salvador, v.13, n.1, p.181-191, 2012

Silva, C. E.; Holanda, F. S. R. **Sustainability indicators for an evaluation of extractive agroecosystems: the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius Raddi*) case in Baixo são Francisco, Brazil.** Scientia Agraria Paranaensis. v.9, n.1, p.15 -36. 2010.

Silva, M. A. et al. **Óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte.** Ciência Rural, Santa Maria. v. 40, n.10, p.2151-2156. 2010.

Silva, T. R. G.; Martins, T. D. D.; Silva, J. H. V.; Silva, L. da Paz G. Pascoal, L. A. F.; Oliveira, E. R. A.; Brito, M. S. **Inclusão de óleos essenciais como elementos fitoterápicos**

na dieta de suínos. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. Salvador, v.13, n.1, p.181-191, 2012.

Simpson, J. M.; McCracken, V. J.; Gaskins, H. R.; Mackie, R. I. **Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53.** Applied Environmental Microbiology. v. 66, p. 4705–4714, 2000.

Sen, S.; Chakraborty, R.; De, B.; Ganesh, T.; Raghavendra, H. G.; Debnath, S. **Analgesic and Anti-Inflammatory Herbs: A Potential Source of Modern Medicine.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. v.1, n.11, p 32-44, 2010.

Smith, M.G.; Jordan, D.; Chapman, T. A.; Chin, J. J. C.; Barton, M. D.; Do, T. N.; Fahy, V. A.; Fairbrother, J. M.; Trott, D. J. **Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistance enterotoxinogenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea.** Veterinary Microbiology. v.145, p.299-307, 2010.

Sogin, M. L.; Morrison, H. G.; Huber, J. A.; Mark Welch, D.; Huse, S. M.; Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proc Natl Acad Sci U S A v.103, p.12115–12120, 2006.

Souza, P. H. M.; Souza Neto, M. H.; Maia, G. A. **Componentes funcionais nos alimentos.** Boletim da SBCTA. v.37, n.2, p.127-135. 2003.

Tao, X.; Xu, Z. **MicroRNA Transcriptome in Swine Small Intestine during Weaning Stress.** PLoS ONE v.8 p.11, 2013.

Tonial, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius Raddi* (aroeira).** 2010. 138f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, PR. 2010.

P. de Azevedo, C. B. do Vale; R. da Trindade, R. N. S.; A. de Araújo, B.; N. de Oliveira, C.; F. M. Vieites, T. P. Bonaparte.; T. Mota. **Óleos essenciais em dietas para leitões recém-desmamados.** Global Science and technology. v. 03, n. 03, p.75– 83, 2010.

Wang, J. P.; Jung, J. H.; Kim, I. H.; **Effects of dietary supplementation with delta-aminolevulinic acid on growth performance, hematological status, and immune responses of weanling pigs.** Livestock Science. v.140. p. 131-135, 2011.

Wijten P. J., van der Meulen J.; Verstegen M. W. **Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review.** British Journal Nutrition. v.105. p. 967–981. 2011.

Windisch, W.; Schedle, K.; Plitzner, C.; Kroismayr, A. **Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry.** Journal of Animal Science. v.86. p.140–E148, 2008.

Zangeronimo, M. G.; Cantarelli, V. de Souza; Fialho, E. T.; de Oliveira, A. N.; Silveira, H.; Pereira, L. de Melo; Pereira, L. J. **Herbal extracts and symbiotic mixture replacing**

APÊNDICES

APÊNDICE A - Peso vivo (kg) dos animais do 1º e 14º dia do período experimental, considerando a média da unidade experimental

Dias de experimento	Bloco	Tratamentos ¹				
		ANT	0	500	1000	1500
1º dia	1	6,93	6,97	6,99	6,96	6,92
	2	6,13	6,13	6,14	6,14	6,13
	3	5,77	5,75	5,75	5,75	5,76
	4	5,38	5,40	5,40	5,38	5,38
	5	5,09	5,04	5,06	5,08	5,08
	6	4,57	4,59	4,60	4,59	4,58
	Média	5,64	5,65	5,66	5,65	5,64
14º dia	1	9,7	7,92	8,33	7,51	7,88
	2	8,28	8,07	7,96	7,73	8,08
	3	7,01	6,92	6,95	7,84	6,79
	4	6,57	7,31	7,04	7,30	7,15
	5	7,01	5,46	6,48	5,48	6,49
	6	5,5	5,67	5,82	6,25	6,19
	Média	7,35	6,89	7,10	7,02	7,09

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE B - Consumo diário de ração (g) no período de 1 a 14 dias, considerando a média da unidade experimental

Dias de experimento	Bloco	Tratamentos ¹				
		ANT	0	500	1000	1500
1º a 14º dia	1	345,4	192,0	195,9	177,6	145,8
	2	244,0	224,2	195,8	183,0	264,6
	3	193,5	232,0	214,9	218,4	161,2
	4	169,0	235,2	207,6	212,2	206,7
	5	259,2	170,8	176,4	198,6	216,7
	6	154,9	166,7	180,1	231,7	198,6
	Média	227,6	203,5	195,1	203,6	198,9

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE C - Ganho diário de peso (g) no período de 1 a 14 dias, considerando a média da unidade experimental

Dias de experimento	Bloco	Tratamentos ¹				
		ANT	0	500	1000	1500
1° a 14° dia	1	213,8	73,3	103,0	42,5	73,8
	2	166,1	149,2	140,0	122,6	149,7
	3	95,8	90,2	92,3	160,5	79,4
	4	88,2	147,1	126,6	148,2	136,4
	5	155,3	32,8	109,7	138,6	108,7
	6	71,7	83,5	94,3	127,6	124,1
	Média	131,8	96,0	111,0	123,3	112,0

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE D - Conversão alimentar no período de 1 a 14 dias, considerando a média da unidade experimental

Dias de experimento	Bloco	Tratamentos ¹				
		ANT	0	500	1000	1500
1° a 14° dia	1	1,61	2,61	1,90	4,17	1,97
	2	1,46	1,50	1,39	1,49	1,76
	3	2,01	2,57	2,32	1,36	2,02
	4	1,91	1,59	1,63	1,43	1,51
	5	1,66	5,20	1,60	1,43	1,99
	6	2,15	1,99	1,90	1,81	1,60
	Média	1,80	2,58	1,79	1,95	1,81

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE E - Valores de altura de vilosidade (AV μ m), profundidade de cripta (PC μ m) e relação altura de vilosidade:profundidade de cripta (AV:PC) do duodeno e do jejuno dos animais abatidos ao final do período experimental

Tratamentos ¹	Bloco	AV	PC	AV:PC	AV	PC	AV:PC
		Duodeno	Duodeno	Duodeno	Jejuno	Jejuno	Jejuno
ANT	1	186,95	77,82	2,59	260,82	123,46	2,18
	2	138,98	57,21	2,50	185,95	97,29	1,98
	3	186,43	107,36	1,91	210,96	103,04	2,13
	4	213,99	120,82	1,85	204,76	100,43	2,05
	5	244,84	108,21	2,27	158,69	80,30	2,01
	6	198,68	109,61	1,88	271,52	117,00	2,33
	Média	206,18	96,84	2,17	215,45	103,59	2,11
0	1	151,40	66,56	2,30	243,74	112,33	2,29
	2	190,09	86,22	2,33	259,49	145,18	1,94

	3	148,30	77,71	1,98	208,84	97,47	2,13
	4	165,71	85,14	1,98	200,62	88,99	2,34
	5	181,80	109,54	1,69	198,82	87,95	2,36
	6	216,57	132,89	1,67	196,17	88,22	2,32
	Média	175,64	93,01	1,99	217,95	94,99	2,23
500	1	207,54	81,56	2,62	216,16	98,07	2,29
	2	192,39	93,65	2,21	227,03	98,24	2,34
	3	161,66	77,06	2,20	190,19	82,59	2,31
	4	235,35	96,82	2,54	239,19	118,37	2,19
	5	155,21	89,44	1,78	267,87	107,22	2,53
	6	199,36	106,48	1,96	166,16	74,43	2,24
	Média	191,92	90,83	2,22	217,77	96,49	2,27
1000	1	208,12	77,62	2,73	251,58	108,59	2,36
	2	194,42	90,33	2,20	316,49	161,95	2,02
	3	264,04	120,94	2,25	152,19	71,67	2,33
	4	208,05	91,50	2,32	225,91	93,66	2,41
	5	225,38	126,24	1,83	178,16	91,82	2,09
	6	-	-	-	-	-	-
	Média	220,00	101,33	2,27	224,87	91,44	2,24
1500	1	183,06	109,71	1,75	203,17	108,69	1,92
	2	200,12	87,91	2,38	157,65	82,88	1,92
	3	157,76	91,42	1,79	227,42	112,03	2,09
	4	258,44	101,29	2,83	213,25	103,54	2,17
	5	251,79	128,86	2,07	200,44	84,87	2,49
	6	198,36	120,08	1,72	247,65	106,86	2,48
	Média	208,25	106,54	2,09	218,39	99,81	2,18

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE F - Densidade de vilosidades (DV) do duodeno e do jejuno dos animais abatidos ao final do período experimental

Dias de Experimento	Segmento	Bloco	Tratamentos ¹				
			ANT	0	500	1000	1500
14° dia	Duodeno	1	72,66	63,33	37,66	58,33	56,33
		2	45,33	88,66	71,33	48,66	63,66
		3	50,33	69,66	65,66	65,33	46,33
		Média	52,88	73,88	58,22	57,44	55,44
14° dia	Jejuno	1	49,33	79,66	55,33	56,66	55
		2	75	91	92,33	48	50
		3	66,66	55	72,33	75,33	66
		Média	63,67	75,22	73,33	60	57

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE G - Média da frequência de diarreia (percentagem de dias com diarreia), por unidade experimental, no período de 1 a 14 dias de experimentação

Dias de experimento	Bloco	Tratamentos ¹				
		ANT	0	500	1000	1500
1° a 14° dia	1	54	69	69	62	92
	2	38	77	62	85	31
	3	69	38	62	85	31
	4	54	77	92	62	38
	5	85	23	69	77	38
	6	54	92	62	85	38
	Média	53,80	62,67	64,80	76,0	32,20

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE H - Valores da morfometria de órgãos dos leitões

Dias de experimento	Segmento	Bloco	Tratamentos ¹				
			ANT	0	500	1000	1500
14° dia	Estômago Vazio	1	0,658	0,680	0,765	0,630	0,593
		2	0,730	0,675	0,653	0,666	0,672
		3	0,657	0,696	0,777	0,982	0,704
		4	0,772	0,687	0,746	0,740	0,642
		5	0,821	0,896	0,719	-	0,890
		6	0,728	0,946	0,734	0,822	0,818
		Média	0,730	0,760	0,730	0,770	0,720
14° dia	Fígado	1	2,603	2,166	1,709	2,082	2,294
		2	2,476	2,600	2,324	2,437	2,139
		3	2,224	2,139	2,610	2,636	2,350
		4	2,361	2,534	2,127	2,416	2,081
		5	2,305	2,500	2,500	-	2,517
		6	2,394	2,768	2,360	2,220	2,299
		Média	2,390	2,450	2,270	2,360	2,290
14° dia	Vesícula	1	0,113	0,076	0,089	0,103	0,090
		2	0,120	0,100	0,075	0,151	0,075
		3	0,104	0,103	0,088	0,155	0,075
		4	0,093	0,148	0,097	0,104	0,098
		5	0,144	0,146	0,120	-	0,103
		6	0,115	0,125	0,175	0,105	0,123
		Média	0,110	0,120	0,110	0,120	0,100
14° dia	Rins	1	0,566	0,592	0,472	0,566	0,580
		2	0,742	0,763	0,515	0,528	0,585

		3	0,672	0,541	0,499	0,775	0,584
		4	0,525	0,660	0,608	0,662	0,628
		5	0,504	0,604	0,479	-	0,719
		6	0,602	0,857	0,629	0,629	0,617
		Média	0,600	0,670	0,540	0,640	0,610
14° dia	Baço	1	0,195	0,264	0,179	0,193	0,271
		2	0,287	0,200	0,176	0,201	0,261
		3	0,239	0,232	0,132	0,181	0,150
		4	0,216	0,243	0,180	0,234	0,182
		5	0,144	0,146	0,150	-	0,205
		6	0,216	0,125	0,157	0,175	0,201
		Média	0,210	0,200	0,160	0,200	0,210

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira.

APÊNDICE I - Média da contagem de micro-organismos (log UFC/g de conteúdo do intestino), por unidade experimental, ao 14° dia de experimentação

Tratamentos ¹	Bloco	CBT ² Jejuno	Enter ³ Jejuno	Lacto ⁴ Jejuno	CBT ² Ceco	Enter ³ Ceco	Lacto ⁴ Ceco
ANT	1	7,11	6,00	6,92	9,90	7,00	8,74
	2	7,20	6,00	6,98	9,90	7,30	8,60
	3	7,04	6,30	6,85	9,90	0,00	8,58
	Média	7,12	9,50	5,67	9,95	14,5	8,64
0	1	7,04	6,00	5,70	9,91	7,46	7,97
	2	6,90	6,30	5,70	9,95	7,30	7,99
	3	7,15	6,00	5,60	10,0	7,60	7,95
	Média	7,03	10,0	6,92	9,14	9,50	7,97
500	1	6,85	7,04	6,61	9,90	7,00	8,80
	2	6,85	6,90	6,40	9,90	7,00	8,81
	3	6,90	6,70	6,20	9,90	0,00	8,79
	Média	6,87	15,0	6,40	9,90	8,00	8,80
1000	1	7,08	6,00	6,00	9,78	7,00	8,60
	2	7,04	6,00	6,32	9,60	0,00	8,59
	3	7,11	0,00	6,95	9,85	0,00	8,60
	Média	7,08	7,00	6,42	9,74	6,50	8,60
1500	1	7,00	5,00	7,26	9,30	7,00	8,60
	2	7,04	0,00	7,08	9,30	0,00	8,58
	3	6,90	0,00	7,36	9,48	0,00	8,61
	Média	6,98	3,50	7,23	9,36	6,50	8,59

¹ANT=Antimicrobiano; 0; 500 ; 1000 e 1500 mg/kg de óleo essencial de aroeira; ²Contagem bacteriana total; ³Enterobactérias; ⁴*Lactobacillus*.

