

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

MAIARA ANANDA GRANDO

***BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS
ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA DIETA DE
LEITÕES EM FASE DE CRECHE***

Marechal Cândido Rondon

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

MAIARA ANANDA GRANDO

***BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS
ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA DIETA DE
LEITÕES EM FASE DE CRECHE***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira
Carvalho
Coorientador: Prof. Dr. Newton Tavares Escocard
de Oliveira

Marechal Cândido Rondon

2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Grando, Maiara Ananda
BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS
ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA DIETA DE
LEITÕES EM FASE DE CRECHE / Maiara Ananda Grando; orientador
Paulo Levi de Oliveira Carvalho; coorientador Newton Tavares
Escocard de Oliveira. -- Marechal Cândido Rondon, 2021.
71 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Marechal Cândido
Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
2021.

1. Suínos. 2. Nutrição. 3. Aditivos. 4. Óleos essenciais. I.
Carvalho, Paulo Levi de Oliveira, orient. II. Oliveira,
Newton Tavares Escocard de, coorient. III. Título.

MAIARA ANANDA GRANDO

Blend de óleos essenciais como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho na dieta de leitões em fase de creche

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Mestra em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-Ruminantes/Aquicultura”, APROVADA pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador / Presidente – Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Prof. Dr. Leandro Batista Costa
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR)

Marechal Cândido Rondon, 09 de setembro de 2021.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho**, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Maiara Ananda Grandó**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que a candidata foi considerada **APROVADA** na banca realizada em 09/09/2021, com o trabalho intitulado "**Blend de óleos essenciais como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho na dieta de leitões em fase de creche**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Sem restrições.

Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho – ORIENTADOR/PRESIDENTE
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / Campus de Mal. Cândido Rondon
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Maiara Ananda Grandó**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Interno**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada **APROVADA** na banca realizada em 09/09/2021, com o trabalho intitulado **"Uso de óleos essenciais em dietas para leitões em fase de creche"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)
Campus de Mal. Cândido Rondon



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Leandro Batista Costa**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Maiara Ananda Grandó**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada **APROVADA** na banca realizada em 09/09/2021, com o trabalho intitulado **"Uso de óleos essenciais em dietas para leitões em fase de creche"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Nada a declarar.

Prof. Dr. Leandro Batista Costa
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR)

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho e todas as minhas conquistas
a todos que me apoiaram durante essa trajetória...**

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Rodrigo Dalpiaz, por me apoiar incondicionalmente.

À minha família e amigos, que me acompanharam nessa trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Levi de Oliveira Carvalho, pela oportunidade, pela orientação e paciência durante todo o mestrado.

A todos os integrantes do Grupo GEPS, pelas novas amizades e por toda a ajuda, organização e colaboração na realização do experimento e análises.

Aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, do campus Marechal Cândido Rondon, pelos ensinamentos e auxílio durante todo o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À empresa TECTRON, pela parceria na realização do experimento e análises.

À empresa COPAGRIL, pelo fornecimento dos animais e ingredientes para ração.

Aos funcionários da Fazenda Experimental Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa (Linha Guará), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná de Marechal Cândido Rondon, pela ajuda durante a execução do experimento.

**BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS
ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA DIETA DE
LEITÕES EM FASE DE CRECHE**

RESUMO – A proibição do uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMD) na produção animal demanda a busca por alternativas que sejam capazes de sustentar a produtividade atual e que sejam consideradas seguras. Os óleos essenciais (OE) são aditivos provenientes de plantas que têm demonstrado efeitos positivos sobre o crescimento e a saúde animal. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de um *blend* de OE sobre o desempenho zootécnico, ocorrência de diarreia (OD), perfil hematológico e bioquímico sanguíneo, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos, e *status* antioxidante hepático, de leitões em fase de creche, como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho convencionais. Foram utilizados 135 leitões machos inteiros, com peso corporal inicial médio de $7,09 \pm 0,29$ kg, e final médio de $23,82 \pm 1,53$ kg. O delineamento experimental empregado foi o em blocos casualizados, constituindo cinco tratamentos, com nove repetições de três leitões representando a unidade experimental. Os tratamentos foram compostos por uma dieta basal controle (CN), CN + 125 mg/kg enramicina 8%, como antimicrobiano melhorador de desempenho, (AMD), CN + 100, 200 e 400 mg/kg do *blend* de OE composto por timol, cinamaldeído, D-limoneno e carvacrol (OE100; OE200; OE400). As dietas basais foram divididas em quatro fases (pré-inicial I, pré-inicial II, inicial I e inicial II) e durante todo o período experimental foram avaliadas as variáveis de desempenho zootécnico, peso corporal final médio (PCF), ganho de peso corporal diário médio (GPCDM), consumo de ração diário médio (CRDM), e eficiência alimentar (EA), bem como a ocorrência de diarreia (OD). No final das fases pré-inicial II e inicial II, foi realizada coleta de sangue de 18 animais de cada tratamento para avaliação do perfil hematológico e bioquímico sanguíneo. Ao final do período experimental foram selecionados seis leitões de cada tratamento para avaliação da microbiologia, morfologia e morfometria intestinais, peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos, e *status* antioxidante hepático. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de comparação de média de Student-Newman-Keuls e de Tukey, a 5% de probabilidade. Na fase inicial II, a EA foi melhor para os tratamentos OE400 e OE200, quando comparados ao OE100 ($p < 0,05$). Durante o período total, o OE400 foi mais eficaz no controle da OD que o CN e o OE100 ($p < 0,05$). Entre as variáveis sanguíneas, na fase pré-inicial II, foram observados valores menores ($p < 0,05$) de proteínas totais para o CN. Ainda, o

CN apresentou menor valor de proteínas plasmáticas quando comparado ao AMD, e o OE100 apresentou menor volume corpuscular médio (VCM) que o OE400 ($p < 0,05$). Na fase inicial II, foram observados maior VCM e menor hemoglobina corpuscular média e hemácias para o OE400 quando comparado ao OE100 ($p < 0,05$). Nessa mesma fase, foram obtidos níveis mais altos de bastonetes para o AMD, semelhante ao OE400 e OE200 ($p < 0,05$). A adição de AMD e OE às dietas aumentou ($p < 0,05$) a atividade hepática da enzima antioxidante superóxido dismutase. Os demais parâmetros avaliados não foram influenciados ($p > 0,05$) pelos tratamentos. Em conclusão, a adição do *blend* de OE às dietas de leitões em fase de creche foi capaz de influenciar positivamente a ocorrência de diarreia, perfil hematológico e bioquímico sanguíneo, e o *status* antioxidante hepático dos animais, sem prejudicar o desempenho zootécnico, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos, podendo ser utilizado como alternativa aos AMD convencionais.

Palavras-chave: aditivo fitogênico, antimicrobiano, ocorrência de diarreia, superóxido dismutase.

BLEND OF ESSENTIAL OILS AS AN ALTERNATIVE FOR ANTIMICROBIAL GROWTH PROMOTERS IN DIETS FOR WEANING PIGS

ABSTRACT – The ban on the use of antimicrobial growth promoters (AGP) in animal production demands the search for alternatives that can sustain current productivity and that are considered safe. Essential oils (EO) are plant-derived additives that have shown positive effects on animal health and growth. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of an EO blend on growth performance, occurrence of diarrhea (OD), hematological and blood biochemical profile, intestinal morphometry, morphology and microbiology, relative weight, length, and pH of the content of organs, and hepatic antioxidant status of weaning pigs, as an alternative to conventional AGP. One hundred and thirty-five crossbred entire male piglets, with an average initial body weight of 7.09 ± 0.29 kg and an average final body weight of 23.82 ± 1.53 kg were used. Animals were divided based on a randomized block design into five treatments, with nine replicates of three piglets per experimental unit. Treatments were a negative control diet (NC), NC + 125 mg/kg of enramycin 8%, as antimicrobial growth promoter (AGP), NC + 100, 200 and 400 mg/kg of the EO blend composed of thymol, cinnamaldehyde, D-limonene and carvacrol (EO100; EO200; EO400). Basal diets were divided into four phases (pre-starter I, pre-starter II, starter I and starter II) and throughout the experimental period the growth performance variables such as average daily body weight gain (ADBWG), average daily feed intake (ADFI), average final body weight (AFBW), and feed efficiency (FE), were evaluated, as well as the OD. At the end of the pre-starter II and initial II phases, blood was collected from 18 animals of each treatment to assess blood hematological and biochemical profiles. At the end of the experimental period, six piglets from each treatment were selected for evaluation of intestinal microbiology, morphology and morphometry, organs relative weight, length, and pH of its contents, and hepatic antioxidant status. The data obtained were submitted to the Student-Newman-Keuls (SNK) and Tukey mean comparison tests, at 5% probability. In the initial phase II, the FE was better for treatments EO400 and EO200, when compared to EO100 ($p < 0.05$). During the total period, OE400 was more effective in controlling OD than NC and EO100 ($p < 0.05$). Among the blood variables, in the pre-starter II phase, lower values of total proteins were observed for NC ($p < 0.05$). Furthermore, NC had a lower value of plasma proteins when compared to AGP, and EO100 had a lower mean corpuscular volume (MCV) than EO400 ($p < 0.05$). In the starter II phase, higher MCV and lower mean corpuscular hemoglobin and red blood cells were observed for EO400 when compared to EO100 ($p < 0.05$). In this same phase, higher levels of

band neutrophils were obtained for AGP, similar to EO400 and EO200 ($p < 0.05$). The addition of AGP and EO to the diets increased ($p < 0.05$) the hepatic activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase. The other parameters evaluated were not influenced ($p > 0.05$) by the dietary treatments. In conclusion, the addition of the EO blend to the diets of weaning piglets was able to positively influence the OD, hematological and blood biochemical profile, and the hepatic antioxidant status of the animals, without any impair to the growth performance, intestinal morphometry, morphology and microbiology, relative weight, length, and pH of the content of organs, showing that it can be used as an alternative to conventional AMD.

Keywords: antimicrobial, occurrence of diarrhea, phytogetic additive, superoxide dismutase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das dietas basais experimentais (como base alimentada) .	46
Tabela 2. Composição calculada e analisada das dietas basais experimentais.....	47
Tabela 3. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o desempenho zootécnico de leitões em fase de creche	55
Tabela 4. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre a ocorrência de diarreia (OD) em leitões em fase de creche	56
Tabela 5. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o perfil bioquímico sanguíneo de leitões em fase de creche	57
Tabela 6. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o perfil hematológico de leitões em fase de creche	58
Tabela 7. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre médias da contagem do número de unidades formadoras de colônias (log 10/g) de Enterobactérias, Clostridium sulfito redutores, Bactérias ácido lácticas e Escherichia coli no intestino de leitões em fase de creche.....	59
Tabela 8. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre a morfologia intestinal de leitões em fase de creche	60
Tabela 9. - Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre a morfometria intestinal de leitões em fase de creche.....	61
Tabela 10. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o pH do conteúdo de órgãos digestórios de leitões em fase de creche.....	61
Tabela 11. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o comprimento e o peso relativo de órgãos de leitões em fase de creche	62
Tabela 12. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o status antioxidante hepático de leitões em fase de creche	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC – Critério de Informação de Akaike
ALBM – Albumina
ALT – Alanina aminotransferase
AMD – Antimicrobiano melhorador de desempenho
ANOVA – Análise de variância
ANCOVA – Análise de covariância
AV – Altura de vilosidades
BAL – Bactérias ácido lácticas
CA – Conversão alimentar
CAT – Catalase
CHCM – Concentração da hemoglobina corpuscular média
CRDM – Consumo de ração diário médio
CSR – *Clostridium* sulfito redutores
CV – Coeficiente de variação
E. coli – *Escherichia coli*
EA – Eficiência alimentar
EMB – Eosina azul de metileno
EOR – Espécie de oxigênio reativa
EPM – Erro padrão da média
ETB - Enterobactérias
FA – Fosfatase alcalina
GALT - Tecido linfoide associado ao intestino
GLI – Glicose
GPCDM – Ganho de peso corporal diário médio
GSH – Glutathiona
GSH-Px – Glutathiona peroxidase
GST – Glutathiona s-transferase
HCM – Hemoglobina corpuscular média
HG – Hemoglobinas
HM – Hemácias
HT – Hematócrito
IgA – Imunoglobulina A

kg – kilograma

mL - mililitros

MLG – Modelo linear generalizado

mg - miligramas

MRS – Man, Rogosa e Sharpe

Nrf2 - Fator nuclear derivado de eritróide 2

OD – Ocorrência de diarreia

OE – Óleos essenciais

PC – Profundidade de criptas

PCF – Peso corporal final

PCIA – Peso corporal inicial do animal amostrado na baia

PH – Proteína hepática

PP – Proteínas plasmáticas

PT – Proteínas totais

SNK – Student, Newman, Keuls

SOD – Superóxido dismutase

TGI – Trato gastrintestinal

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TSC –Tryptose sulfito cicloserina

UFC – Unidade formadora de colônia

URE – Ureia

VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO	21
2.1.	Propriedades do Trato Gastrintestinal.....	21
2.2.	Efeitos do Desmame Sobre o TGI de Suínos	23
2.3.	Diferentes Aditivos Utilizados na Alimentação de Suínos.....	25
2.4.	Óleos Essenciais	28
2.4.1.	Métodos de extração	29
2.4.2.	Principais efeitos biológicos e modo de ação	30
2.4.3.	Uso na alimentação de leitões.....	32
2.5.	Referências.....	34
3	<i>BLEND</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA DIETA DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE	39
3.1.	INTRODUÇÃO	42
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.2.1.	Local, animais, alojamento e delineamento experimental.....	44
3.2.2.	Dietas experimentais.....	45
3.2.3.	Desempenho zootécnico e ocorrência de diarreia (OD)	47
3.2.4.	Perfil hematológico e bioquímico sanguíneo.....	48
3.2.5.	Microbiologia intestinal.....	49
3.2.6.	Morfometria e morfologia intestinal.....	50
3.2.7.	Peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos.....	51
3.2.8.	<i>Status</i> antioxidante hepático	51
3.2.9.	Análise estatística	53
3.3.	RESULTADOS	54
3.3.1.	Desempenho zootécnico e ocorrência de diarreia (OD)	54

3.3.2.	Perfil hematológico e bioquímico.....	56
3.3.3.	Microbiologia intestinal.....	59
3.3.4.	Morfometria e morfologia intestinal.....	59
3.3.5.	Peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos.....	61
3.3.6.	<i>Status</i> antioxidante hepático	62
3.4.	DISCUSSÃO	64
3.5.	CONCLUSÃO	68
3.6.	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é, atualmente, a segunda mais produzida no mundo, sendo que em 2020 a produção total foi de 97.757 mil toneladas (ABPA, 2021). Colaborando com 4.436 mil toneladas, em 2020, o Brasil posiciona-se como o quarto maior produtor, e para o ano de 2021 há uma estimativa de crescimento de 5% em sua produtividade (USDA, 2021).

Além das constantes melhorias implementadas nas práticas de manejo, um fator que ajudou a produtividade animal alcançar o presente patamar mundial foi o uso de agentes antimicrobianos (BROWN *et al.*, 2017). Desde os anos 50, essas substâncias têm sido utilizadas na suinocultura de três formas, terapêutica, profilática ou metafilática, e como melhoradora de desempenho, também chamados de antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMD) (BARTON, 2014).

O padrão de utilização dos AMD, como a adição contínua e em doses mais baixas que as terapêuticas, somado ao uso indiscriminado, promove a situação ideal para o desenvolvimento de bactérias resistentes no trato gastrointestinal (TGI) dos animais. As bactérias têm a capacidade de transferir material genético entre suas diferentes espécies por mecanismos variados, o que possibilita a transferência de genes de resistência entre a microbiota dos animais tratados com AMD (BARTON, 2014; BROWN *et al.*, 2017).

A contaminação do ambiente com esses microrganismos se torna um risco para a saúde de animais e humanos. Por esse motivo, vários países estão implementando políticas mais restritivas e até mesmo banindo o uso de AMD na alimentação animal (THACKER, 2013; BARTON, 2014; SOUCY *et al.*, 2015).

O relatório anual da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) sobre agentes antimicrobianos destinados ao uso em animais, publicado em 2020, destacou que, em 2016, nos países que ainda faziam uso de AMD, os suínos estavam em quarto lugar entre as espécies com mais indicações de uso dessas substâncias. O relatório ainda demonstra que, em 2018, substâncias como a enramicina lideravam a lista dos principais AMD utilizados na produção animal mundial (GÓCCHÉZ *et al.*, 2020).

A resposta dos animais sob uso dos AMD varia ao longo das fases de criação, sendo que animais mais jovens, como os leitões, apresentam maior resposta frente ao uso desses antimicrobianos quando comparados a animais adultos. Os animais jovens estão mais suscetíveis a agentes estressores e ao desenvolvimento de infecções, sendo mais beneficiados pela ação dos AMD (LAXMINARAYAN *et al.*, 2015).

Um dos principais estressores aos que leitões são submetidos é o manejo de desmame, que comumente ocasiona redução do consumo alimentar, diminuição do ganho de peso corporal, aumento da ocorrência de diarreia e injúrias ao epitélio intestinal (JAYARAMAN; NYACHOTI, 2017).

A retirada dos AMD no setor de produção animal tem gerado efeitos sobre a ocorrência de infecções nos animais, como quadros de colite em suínos, além da redução no desempenho dos lotes (MA *et al.*, 2020). Por esse motivo, a busca por alternativas a essas substâncias tem aumentado nas últimas décadas.

Existem diferentes tipos de aditivos com indicação de uso na alimentação animal que têm sido estudados devido aos seus possíveis benefícios sobre o TGI dos suínos, favorecendo o desempenho dos animais, como os acidificantes, probióticos, prebióticos, enzimáticos e fitogênicos (LIU *et al.*, 2018).

Os aditivos fitogênicos, são aditivos derivados de plantas, aos quais pertencem os óleos essenciais (OE), que são substâncias extraídas das plantas por meio de processos como destilação a vapor, e que possuem potencial para uso alternativo aos AMD (WINDISCH *et al.*, 2008; OMONIJO *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado efeito antimicrobiano dos OE sobre bactérias patogênicas como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Clostridium perfringens* (OUWEHAND *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2017), regulação da expressão de genes inflamatórios celulares (VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2021), potencial antioxidante (KEBEDE *et al.*, 2021), além de beneficiar o ganho de peso de animais (SU *et al.*, 2018).

Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de um *blend* de OE sobre o desempenho zootécnico, ocorrência de diarreia (OD), perfil hematológico e bioquímico sanguíneo, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos, e status antioxidante hepático, de leitões em fase de creche, como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMD) convencionais.

2 REVISÃO

2.1. Propriedades do Trato Gastrointestinal

O metabolismo e o desempenho animal estão intimamente relacionados ao bom funcionamento do trato gastrointestinal (TGI) (PLUSKE *et al.*, 2018) visto que seu epitélio representa a maior área de interação entre o organismo e o ambiente externo (IFTEKHAR; SIGAL, 2021). Ao adentrar o lúmen do TGI, um antígeno, seja um fator antinutricional, um xenobiótico, ou uma bactéria, encontra vários mecanismos de proteção.

A combinação de barreiras físicas e químicas destinadas a constante prevenção da aderência e invasão de patógenos à mucosa intestinal caracteriza a primeira linha de defesa do TGI. Como exemplo inicial, é possível citar as secreções estomacais, que conferem um ambiente ácido apropriado para a ativação de enzimas digestivas e ao mesmo tempo ocasiona a inativação de possíveis patógenos (MCELROY *et al.*, 2018).

A camada mais externa do intestino, denominada mucosa, é composta pelo epitélio, pela camada de muco que reveste o epitélio e pelo tecido linfóide associado ao intestino, também chamado de GALT (do inglês *gut-associated lymphoid tissue*). As interações entre esses componentes e a microbiota residente formam um complexo dinâmico que necessita estar em equilíbrio para assegurar a boa funcionalidade do sistema digestório e a função de barreira protetora (CELI *et al.*, 2017).

O epitélio intestinal é caracterizado por uma camada única de células, que possui uma alta taxa de renovação celular, atingindo uma renovação completa em poucos dias. No intestino delgado, as células-tronco migram da base das criptas para o topo dos vilos, onde diferenciam-se em diversas células, como células digestivas, denominadas enterócitos, ou células secretoras, denominadas caliciformes, enteroendócrinas e de Paneth (GASSLER, 2017; VERDILE *et al.*, 2019).

Os enterócitos são as células presentes em maior quantidade no epitélio intestinal e possuem microvilosidades na sua superfície luminal, as quais aumentam a área de contato com os substratos. Por meio da liberação de enzimas, realizam a digestão de alimentos, e por meio de um conjunto de transportadores apicais e basolaterais, realizam a absorção de nutrientes, água e eletrólitos (MOESER *et al.*, 2017).

As células secretoras participam da defesa do epitélio intestinal, dentre elas estão as células caliciformes e de Paneth, que secretam mucina e compostos antimicrobianos,

respectivamente (MOESER *et al.* 2017). As células de Paneth localizam-se na base das criptas dos vilos, próximas as células-tronco, protegendo-as, de maneira a preservar a capacidade regenerativa do intestino. Dentre os compostos secretados por essas células estão peptídeos, lisozimas, e citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (MCELROY *et al.*, 2018; VERDILE *et al.*, 2019). Enquanto, as células enteroendócrinas tem papel importante na detecção de patógenos e na liberação de hormônios, que participam tanto na resposta imune quanto na regulação do apetite (MOESER *et al.*, 2017).

Entre as células epiteliais estão as junções firmes (do inglês *tight-junctions*), que são estruturas responsáveis pela união celular, formadas por proteínas presentes nas membranas dispostas de maneira intra e intercelulares. São as principais responsáveis pelo controle da permeabilidade intestinal, regulando o transporte paracelular de água e substâncias, e impedindo a passagem de patógenos (ZUO *et al.*, 2020).

O GALT é outro componente importante do sistema de defesa intestinal e pode ser dividido em duas zonas, as indutoras e as efectoras. As indutoras representam as estruturas onde há o início das respostas imunes, caracterizado pela captação e processamento de antígenos e ativação de células imunes. Essas estruturas são os nódulos linfáticos presentes no mesentério, e as placas de Peyer, os folículos linfoides e os aglomerados linfoides imaturos, presentes na lâmina própria. As zonas efectoras são as células imunes em si, como os linfócitos B e T, que uma vez ativadas modulam a resposta imune e inflamatória (MCELROY *et al.*, 2018).

Outra contribuição das células epiteliais ao sistema de barreira é pelo transporte da imunoglobulina A (IgA) através do epitélio. A IgA é produzida nas zonas do GALT da lâmina própria e tem papel importante na neutralização inespecífica de microrganismos. As células M, também presentes no epitélio realizam endocitose e transporte de antígenos para as células do sistema imune presente no GALT (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A mucosa do intestino grosso compartilha muitas características com a do intestino delgado, no entanto, no intestino grosso não há vilosidades, apenas criptas, e não há presença de células de Paneth, sendo os enterócitos os responsáveis pela secreção de peptídeos antimicrobianos (IFTEKHAR; SIGAL, 2021).

Em adição, há a microbiota, que também, atua na função de barreira intestinal. Os diferentes microrganismos residentes contribuem positivamente com o TGI dos suínos, atuando na competição com organismos patogênicos, produção de fatores antimicrobianos e de substâncias que atuam como moduladoras do sistema endócrino e imune do animal,

digestão de nutrientes menos digestíveis e de fatores antinutricionais, síntese de ácidos graxos de cadeia curta e de vitaminas que beneficiam o organismo animal (WANG, H. *et al.*, 2020).

Existem vários mecanismos envolvidos na regulação do TGI, a fim de manter um balanço positivo entre o organismo, a microbiota e a dieta. Celi *et al.* (2017) propuseram a definição de saúde intestinal como um *status* estável, onde a microbiota e o trato intestinal existem em equilíbrio simbiótico e onde o bem-estar e o desempenho do animal não são limitados por disfunções.

Em sua essência, o TGI é responsável por garantir o aporte de nutrientes necessários ao desenvolvimento animal e todos os mecanismos de proteção relacionados a ele existem para assegurar sua função base. Por isso, é necessário entender sua funcionalidade para atuar efetivamente na manutenção do equilíbrio intestinal dos suínos submetidos aos desafios que acompanham a cadeia produtiva.

2.2. Efeitos do Desmame Sobre o TGI de Suínos

O TGI dos suínos começa a se desenvolver ainda no período pré-natal e atinge sua maturidade meses após o nascimento do animal. Ainda assim, um dos maiores desafios ao TGI ocorre no início da vida dos suínos domésticos, no período de desmame (JAYARAMAN; NYACHOTI, 2017; MOESER *et al.*, 2017). Na natureza, a desmama do leitão ocorre de maneira gradual, entre 14 e 17 semanas de idade, coincidindo com a maturação de seu sistema digestório (JENSEN, 1986; MOESER *et al.*, 2017). No entanto, nas criações comerciais modernas o desmame é prematuro, ocorrendo entre a 3^a e 5^a semana de vida.

Devido a mudança repentina das condições ambientais, sociais, e dietéticas às quais os animais estão submetidos, o desmame é considerado um período crítico. Diferentes agentes estressores caracterizam esse momento, como a separação do leitão e da porca, transporte e manejo, novo ambiente, diferente forma física de alimento, interação com diferentes leitegadas e contato com diferentes patógenos ambientais. O suíno jovem precisa se adaptar a esses fatores para garantir um desempenho zootécnico satisfatório (CAMPBELL *et al.*, 2013).

Durante a fase pré-desmame, o TGI do leitão secreta enzimas necessárias para a digestão do leite materno, que é a sua principal fonte alimentar, moldando assim sua microbiota, que se caracteriza principalmente por bactérias ácido lácticas (PETRI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2021).

Alterações transitórias e permanentes são observadas no TGI do suíno após o desmame (BOUDRY *et al.*, 2004). A troca da dieta líquida para sólida, baseada principalmente em cereais, ocasiona redução do consumo de água e alimento com conseqüente queda da taxa de crescimento corporal (BUCHET *et al.*, 2017).

A anorexia pós-desmame pode gerar efeitos negativos sobre o funcionamento do epitélio intestinal, como atrofia de vilosidades e hiperplasia de criptas (BOMBA *et al.*, 2014; DEGROOTE *et al.*, 2020). Conseqüentemente, a digestão e absorção de nutrientes é afetada, uma vez que os enterócitos presentes na superfície epitelial dos vilos são responsáveis pela liberação de enzimas digestivas e, também, pelo transporte celular de substâncias (GRESSE *et al.*, 2017).

A introdução de uma nova fonte de alimento expõe o leitão a compostos que são percebidos pelo sistema imune intestinal como antígenos, influenciando tanto a microbiota intestinal quanto a resposta imune (MOESER *et al.*, 2017). Sob condições de inflamação intestinal, há produção de espécies de oxigênio e de nitrogênio reativas, como por exemplo, óxido nítrico, o qual uma vez presente no lúmen é rapidamente convertido a nitrato. Essa substância favorece a proliferação de algumas bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, resultando em disbiose intestinal (ZENG *et al.*, 2017; PLUSKE *et al.*, 2018; GUEVARRA *et al.*, 2019).

A ativação de genes inflamatórios e imunes, também, ocorre em resposta aos múltiplos agentes estressores desse período, ocasionando, por exemplo, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da expressão de proteínas das junções firmes, afetando a permeabilidade intestinal. (HEO *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2013; JAYARAMAN; NYACHOTI, 2017; BUCHET *et al.*, 2017). Danos à função de barreira epitelial intestinal podem afetar o transporte paracelular, permitindo que toxinas, bactérias e compostos alergênicos adentrem a corrente sanguínea e causem injúrias sistêmicas (BOMBA *et al.*, 2014).

Os diversos efeitos do desmame sobre o TGI dos leitões invariavelmente resultam em diarreia pós-desmame, desidratação, redução do consumo de ração, redução da digestibilidade dos nutrientes, redução do crescimento, e até mesmo, morte dos animais. Portanto, é possível afirmar que o bom desenvolvimento dos leitões durante a fase de creche depende da implementação de medidas que auxiliem o animal na superação do processo de desmame e um fator chave para isso é a utilização de intervenções nutricionais e aditivos alimentares que auxiliem a saúde intestinal.

2.3. Diferentes Aditivos Utilizados na Alimentação de Suínos

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004), aditivo destinado à alimentação animal é:

substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais.

Até recentemente os agentes antimicrobianos melhoradores de desempenho, também chamados de AMD, se enquadravam nessa definição. Antimicrobianos são substâncias naturais, sintéticas, ou semissintéticas, que exibem atividade antimicrobiana - causam morte ou inibição do crescimento de microrganismos - em concentrações atingíveis *in vivo* (OIE, 2019). Na criação intensiva de suínos, essas substâncias são administradas com maior frequência nas fases iniciais, para prevenir infecções do TGI (SCHOKKER *et al.*, 2015).

Os antimicrobianos têm sido utilizados rotineiramente na produção animal, desde a década de 50, como melhoradores de desempenho (BROWN *et al.*, 2017; LEKAGUL *et al.*, 2019). Os AMD são adicionados à dieta dos animais em doses subterapêuticas com o intuito de auxiliar o desempenho dos animais. Isso ocorre por meio da redução da carga de bactérias patogênicas no intestino, com consequente redução dos efeitos deletérios desses patógenos sobre o epitélio e diminuição de competição por nutrientes com o hospedeiro (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2020).

Enquanto algumas classes de AMD são utilizadas apenas na pecuária (i.e., ionóforos) outras são utilizadas também na medicina humana (i.e., penicilinas, tetraciclinas) (LEKAGUL *et al.*, 2019). Ao longo dos anos, o uso desses antimicrobianos em animais se tornou indiscriminado, levantando a preocupação quanto ao possível surgimento de bactérias resistentes a esses princípios ativos (BROWN *et al.*, 2017).

As bactérias têm a capacidade de transferir material genético entre suas diferentes espécies por mecanismos variados, como transferência de plasmídeo ou transdução mediada por bacteriófago, o que possibilita a transferência de genes de resistência entre a microbiota dos animais tratados com AMD (SOUCY *et al.*, 2015). Essa possível emergência de bactérias resistentes com potencial patogênico a humanos tem levado agências regulatórias em todo o

mundo a controlar o uso dessas substâncias na cadeia produtiva animal (BROWN *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm focado no desenvolvimento de alternativas aos AMD para manter a saúde e o desempenho dos suínos. Dentre os possíveis substitutos destacam-se alguns aditivos alimentares, como os probióticos, prebióticos, acidificantes e, os fitogênicos (THACKER, 2013; LIU *et al.*, 2018).

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001). No entanto, para serem utilizados na indústria algumas características específicas são levadas em consideração, como a possibilidade de serem produzidos em grande escala; a habilidade de colonizarem o TGI, e para isso é necessário serem resistentes às secreções gástricas; a capacidade de promoverem a saúde intestinal, seja pela interação com o sistema imune local ou pela redução de bactérias indesejáveis; e não serem tóxicos ou patogênicos (GAGGIÀ *et al.*, 2010; BARBA-VIDAL *et al.*, 2019).

Leveduras e bactérias são os principais organismos utilizados como probióticos, com destaque para as bactérias produtoras de ácido láctico, como as espécies *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, e *Bifidobacterium spp* (YANG *et al.*, 2015; LIAO; NYACHOTI, *et al.*, 2017). Por meio da alteração da composição da microbiota intestinal, os aditivos contendo esses microrganismos auxiliam na digestão e absorção de nutrientes, regulação da resposta imune e morfologia intestinal (TRCKOVA *et al.*, 2014; DING *et al.*, 2020).

Outra classe de aditivos é a dos prebióticos, que pode ser definida como um substrato que é utilizado seletivamente pela microbiota, conferindo um benefício à saúde do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2017). Devem ser substâncias indigeríveis pelas secreções digestivas do TGI animal, e fermentáveis pela microbiota benéfica (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2020).

A maioria dos prebióticos utilizados na alimentação animal pertencem ao grupo dos carboidratos não digestíveis, como a inulina, os frutooligossacarídeos e galactooligossacarídeos (DUCATELLE *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2018). A fermentação desses compostos no intestino, por grupos bacterianos específicos, resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido propiônico, ácido butírico e ácido láctico, os quais modulam o pH luminal e servem como fonte de energia para os enterócitos (ZAMBELL *et al.*, 2003; AZAD *et al.*, 2020).

Os aditivos acidificantes também têm sido considerados alternativas aos AMD nas dietas para suínos, devido a sua habilidade em reduzir o pH do TGI e assim favorecer a microbiota comensal, a digestão de nutrientes, o desempenho animal e reduzir a incidência de

diarreia. Esse grupo abrange os ácidos orgânicos, ácidos inorgânicos e os sais de ácidos (KIL *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2018; LONG *et al.*, 2018). No entanto, esses compostos têm capacidades distintas de alterar o pH do meio variando de acordo com sua constante de dissociação (SAKOMURA *et al.*, 2014).

Os ácidos orgânicos compreendem um conjunto de compostos químicos, sendo os mais comuns os ácidos carboxílicos. Entre os que são utilizados na alimentação de suínos, se destacam os ácidos benzóico, acético, butírico e láctico (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2020). Dentre os ácidos inorgânicos comumente utilizados está o ácido fosfórico. Com relação aos sais de ácidos, destacam-se o diformiato de potássio, formiato de cálcio e o butirato de sódio (LIU *et al.*, 2018; LUISE *et al.*, 2020).

Outro mecanismo pelos quais os acidificantes são capazes de modular a microbiota é a capacidade de se difundirem passivamente através da membrana celular das bactérias patogênicas. Uma vez no interior delas, eles se dissociam para produzir prótons e ânions, comprometendo o equilíbrio osmótico do citoplasma e, assim, reduzindo a viabilidade celular. Os ácidos orgânicos que apresentam capacidade antimicrobiana são os de cadeia curta, pois possuem maior capacidade de se ionizarem (WARNECKE; GILL, 2005; SAKOMURA *et al.*, 2014).

Os aditivos fitogênicos compreendem produtos derivados de plantas obtidos a partir do processamento de suas diversas partes, como flores, folhas, raízes e caules (WINDISCH *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2018). Podem ser classificados de acordo com sua origem e processamento, sendo o maior destaque para os óleos essenciais, que são compostos voláteis obtidos por meio de destilação alcoólica, ou a vapor, ou prensagem a frio (WINDISCH *et al.*, 2008).

Os OE são produtos de interesse na nutrição animal devido a potenciais funções biológicas, como atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (O'BRYAN *et al.*, 2015; OMONIJO *et al.*, 2018; VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2021). Os compostos que têm se destacado na suinocultura são o timol, eugenol, carvacrol e cinamaldeído, no entanto, estima-se que existam mais de três mil tipos de óleos essenciais em plantas (THACKER, 2013; OMONIJO *et al.*, 2018), possibilitando vastos estudos.

Pesquisas recentes têm evidenciado o potencial de uso dos OE como substitutos aos AMD nas dietas de suínos, com efeitos positivos sobre o desempenho, função imune e *status* oxidativo desses animais.

2.4. Óleos Essenciais

Os OE são compostos naturais e voláteis encontrados em vegetais, que possuem baixo peso molecular e são solúveis em lipídios, álcool e outras substâncias hidrofóbicas. Nas plantas, são armazenados em células especializadas presentes nas folhas, flores, frutos, cascas, raízes e/ou sementes (CARSON; HAMMER, 2011). São considerados metabólitos secundários e sua presença nas plantas pode variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos, como variações genéticas, fase de desenvolvimento, clima e região (BUCKLE, 2014; ČABARKAPA *et al.*, 2020).

Em geral, esses compostos são hidrocarbonetos, alguns possuem derivados oxigenados e outros podem conter nitrogênio ou enxofre em sua cadeia química (CARSON; HAMMER, 2011). Dentre os diferentes grupos químicos aos quais eles se encaixam, predominam os terpenos e os fenilpropanóides (DE SOUSA, 2015).

Os terpenos compõem o maior grupo de compostos naturais e são formados por moléculas de isoprenos (C_5H_8). Os cíclicos contêm anel benzeno em sua estrutura química e são conhecidos como terpenos aromáticos (BUCKLE, 2014). Muitas vezes esse anel contribui de maneira significativa para a atividade biológica do OE, especialmente quando está unido à uma hidroxila, formando um fenol. Em adição, existem terpenos acíclicos e irregulares. Alguns exemplos de terpenos são o timol, o limoneno e o carvacrol (CARSON; HAMMER, 2011).

A classe dos fenilpropanóides engloba compostos originados a partir dos aminoácidos fenilalanina e, em menor proporção, tirosina. Possuem estrutura química formada por um anel fenol de seis carbonos com uma cadeia lateral de três carbonos (ILJEVA; BUCHBAUER, 2016). Esses compostos ocorrem menos frequentemente que os terpenóides, sendo que apenas cerca de 50 fenilpropanóides foram descritos, dentre eles se destacam o eugenol e o cinamaldeído (CARSON; HAMMER, 2011).

Apesar de os OE serem chamados de óleos, não devem ser confundidos com lipídios, pois não possuem ácidos graxos ou triglicerídeos em sua estrutura química. Outra denominação que eventualmente é relacionada com os OE é a de óleo funcional, que engloba substâncias de características lipofílicas que podem exercer funções diversas no organismo, não relacionadas a produção de energia. Em geral, todos os OE são óleos funcionais, mas nem todos os óleos funcionais são OE (TORRENT, 2014).

2.4.1. Métodos de extração

Os OE podem ser extraídos das plantas por diferentes maneiras, considerando o tipo e forma do material vegetal utilizado (STRATAKOS; KOIDIS, 2016). Nesses extratos podem ser encontrados mais de 60 componentes em concentrações variadas, sendo que um ou dois estão em maior concentração e determinam as propriedades biológicas principais. Componentes específicos também podem ser isolados a partir dessas misturas (DAWIDOWICZ; OLSZOWY, 2014).

A extração é o primeiro fator determinante da qualidade do produto, visto que o procedimento inadequado pode acarretar danos à estrutura química das moléculas, resultando na perda de sua atividade (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

A destilação a vapor é o método tradicionalmente utilizado para a extração de OE. As partes das plantas são expostas à água fervente ou vapor até que a estrutura celular seja rompida e os compostos voláteis sejam liberados. Os OE evaporam e na sequência são condensados e separados (EL KHARRAF *et al.*, 2020).

A prensagem a frio é o método mais antigo, e é quase que exclusivamente utilizado para a extração de OE cítricos, devido à instabilidade desses compostos quando expostos a fontes térmicas. Nesse procedimento as glândulas lipídicas dos vegetais são rompidas para a liberação dos compostos, resultando numa emulsão aquosa, que é subsequentemente centrifugada para separação dos OE (STRATAKOS; KOIDIS, 2016).

De acordo com a Organização Internacional de Normalização, conforme descrito na ISO 9235:2013, OE são produtos obtidos a partir de uma matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos (plantas cítricas), ou por destilação a seco após a separação da fase aquosa - se houver - por processos físicos. No entanto, há outros métodos utilizados para a extração de compostos presentes nas plantas, como por exemplo, extração por solventes, *enfleurage* e extração com fluido supercrítico, que resultam na extração de produtos com características semelhantes às dos OE (BUCKLE, 2014).

Logo, a eleição do método de extração deve levar em consideração o composto químico que se deseja obter, a espécie de planta utilizada e a parte dela que será processada, a fim de garantir um produto de qualidade.

2.4.2. Principais efeitos biológicos e modo de ação

Os OE são conhecidos pela sua capacidade de proteger as plantas de predadores, porém, executam diversas funções biológicas nos vegetais que ainda não foram totalmente elucidadas. Devido as suas características químicas, podem apresentar atividades antimicrobianas, antiparasitárias, anti-inflamatórias, e antioxidantes, tornando-os atrativos para uso comercial (CARSON; HAMMER, 2011).

A atividade antimicrobiana desses compostos têm sido foco da indústria alimentícia, devido sua maior segurança de uso e menor relação com resíduos indesejáveis nos alimentos quando comparados aos AMD. Alguns estudos sugerem que quando os OE são administrados oralmente, na forma não encapsulada, são rapidamente absorvidos pelo TGI (cerca de duas horas), principalmente no estômago e início do intestino delgado. Em seguida, permeiam os tecidos corporais por meio da circulação sanguínea, sendo que a maior parte é metabolizada pelos rins e excretada na urina, com baixa possibilidade de acúmulo nos tecidos (KOHLERT *et al.*, 2000; MICHIELS *et al.*, 2008).

O'Bryan *et al.* (2015) revisaram o potencial antibacteriano dos OE e seus modos de ação e concluíram que o principal mecanismo dos OE é a alteração da permeabilidade das membranas celulares das bactérias, resultando em perda de componentes celulares e influxo de outras substâncias para o interior da célula.

Esse potencial antibacteriano dos OE, além de ser influenciado pela conformação química de cada composto, também é influenciado pelas características de cada bactéria. As bactérias Gram-positivas possuem parede celular espessa, de característica hidrofóbica, composta principalmente de peptidoglicanos e ácido lipoteicóico (GROMAN, 2015). Enquanto, as bactérias Gram-negativas possuem parede celular mais fina e uma membrana externa a essa, composta principalmente de fosfolipídios e lipopolissacarídeos (NAZZARO *et al.*, 2013). Essa estrutura celular mais complexa, de característica hidrofílica, torna as bactérias Gram-negativas menos suscetíveis que as Gram-positivas a ação dos OE, no entanto, alguns OE conseguem adentrar essa barreira externa por meio das porinas ali presentes (O'BRYAN *et al.*, 2015).

Xu *et al.* (2008) avaliaram o mecanismo de ação do carvacrol e do timol contra *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa, por meio da utilização de citometria de fluxo e corantes fluorescentes. Esses autores verificaram que os compostos afetaram a integridade da membrana celular da bactéria, resultando no aumento da permeabilidade, vazamento de prótons e potássio, e perda do potencial de membrana.

Radünz *et al.* (2019) avaliaram o potencial antimicrobiano do OE de cravo (*Syzygium aromaticum* L.), composto principalmente por eugenol, e observaram forte efeito inibitório *in vitro* sobre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e as Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium. Ouwehand *et al.* (2010) avaliaram o efeito *in vitro* de 13 OE sobre o crescimento de bactérias patogênicas (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus epidermis*) e bactérias benéficas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) sob condições de anaerobiose. Os compostos que apresentaram maior capacidade antimicrobiana foram carvacrol, cinamaldeído e timol. Os autores também observaram que as bactérias benéficas foram mais resistentes a ação dos OE, o que enfatiza o potencial de uso desses aditivos no controle de patógenos intestinais sem afetar a microbiota comensal.

Outra atividade dos OE que tem recebido atenção é a de antioxidante (AMORATI *et al.*, 2013). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio no organismo. Essas espécies são moléculas instáveis que contêm elétrons não pareados em sua camada de valência. São moléculas geradas durante o processo de respiração celular, sendo a mitocôndria o local primário de produção. Possuem a capacidade de reagir com proteínas, lipídios e DNA celular, além de atuar como sinalizadores de vias metabólicas, resultando na ativação do sistema imune e inflamação dos tecidos (WANG, Y. *et al.*, 2020).

Fatores alimentares, ambientais e intrínsecos podem influenciar a produção dessas substâncias. Alguns exemplos de espécies de oxigênio reativas são o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), radical peroxila (ROO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), entre outros. Óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2) e trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) são exemplos de espécies de nitrogênio reativas (SIES; JONES, 2020).

Para manter o equilíbrio oxidativo, o organismo é equipado com um sistema de defesa, que consiste em antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Os antioxidantes não enzimáticos incluem glutathione, tioredoxina e irisina. A SOD é uma enzima que tem como foco a neutralização do radical superóxido, já a CAT e a GSH-Px atuam principalmente sobre o peróxido de hidrogênio (WANG, Y. *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos presentes nos OE contribuem para o sistema antioxidante corporal, devido a sua estrutura química, que é capaz de neutralizar radicais livres por meio da

troca de elétrons, além de modularem a liberação de enzimas antioxidantes (AMORATI *et al.*, 2013). Kebede *et al.* (2021) avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de *Curcuma domestica* pelo método DPPH, o qual é baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Os resultados obtidos indicaram que conforme o aumento da concentração do extrato ocorreu aumento da capacidade de eliminação dos radicais. Em outro estudo, Senthilkumar *et al.* (2020) avaliaram a capacidade antioxidante dos OE das sementes de *Moringa peregrina* e observaram que o composto apresentou atividade contra o radical DPPH, radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.

Manjamalai e Grace (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de óleos essenciais de *Wedelia chinensis* em ratos inoculados com células cancerígenas, e observaram que o grupo tratado com os OE apresentou níveis mais altos das enzimas CAT, SOD, GSH-Px, nos tecidos pulmonar e hepático, quando comparado ao grupo não tratado, evidenciando a capacidade dos óleos essenciais em modular as enzimas do sistema antioxidante do organismo.

Vários estudos realizados em laboratório têm demonstrado atividades biológicas dos OE de grande utilidade para a indústria pecuária e alimentícia, as quais precisam ser verificadas por meio de estudos *in vivo*.

2.4.3. Uso na alimentação de leitões

Estudos recentes têm documentado o potencial de uso dos OE na alimentação de leitões. Suas propriedades químicas podem influenciar o funcionamento do TGI, o que associado aos intensos desafios enfrentados pelos leitões durante o período de creche, torna os OE ferramentas nutricionais interessantes e possíveis alternativas aos AMD.

Dong *et al.* (2019) avaliaram o uso de diferentes doses de OE de *Melaleuca alternifolia* (50, 100 e 150 mg/kg), na dieta de leitões com 21 dias de idade, e verificaram efeitos positivos sobre a imunidade da mucosa intestinal, com efeitos superiores ao tratamento contendo antibióticos.

Em outro estudo, Wei *et al.* (2017) avaliaram o uso de 100 mg/kg de um *blend* a base de carvacrol e timol na alimentação de leitões desmamados e, apesar de não terem verificado efeitos sobre o desempenho dos animais, observaram menor população de *Escherichia coli* e maior população de *Lactobacillus* no conteúdo do jejuno. Também, observaram aumento na atividade sérica das enzimas SOD e GSH-Px e redução na expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α .

Tian e Piao (2019) compararam o uso de 100 mg/kg de um *blend* de OE, composto em 13,5% por timol e 4,5% por cinamaldeído, com o uso de antimicrobianos (AB) e um grupo controle (CT), na alimentação de leitões desmamados. Os autores não observaram diferença no desempenho dos animais entre os tratamentos durante o período total, no entanto, observaram menor ocorrência de diarreia para os grupos OE e AB. Em adição, visualizaram maior expressão de enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px no jejuno dos animais recebendo OE, no entanto, não houve o mesmo efeito no segmento do íleo e no fígado.

O uso de diferentes doses (50, 100 e 200 mg/kg) de um produto contendo 13,5% de timol e 4,5% de cinamaldeído, na alimentação de leitões pós-desmame, foi avaliado por Su *et al.* (2018). Os pesquisadores observaram efeito para a taxa de conversão alimentar, sendo que os grupos tratados com doses mais altas do *blend* obtiveram menor conversão. Conjuntamente, foram observados valores mais altos de glutatona na mucosa intestinal para a maior inclusão do *blend*.

Os diferentes dados observados com o uso de OE na alimentação de leitões evidenciam o potencial de uso desses compostos como ferramentas para modular a saúde intestinal dos animais, sendo possíveis substitutos aos antimicrobianos melhoradores de desempenho. No entanto, devido a ampla variedade de OE que podem ser extraídos das plantas, são necessárias constantes avaliações de suas utilizações, pois as diferentes combinações e concentrações utilizadas podem resultar em diferentes efeitos sobre os parâmetros animais.

2.5. Referências

- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.46, p.10835-10847, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Relatório Anual 2021**. 2021. p.1-146.
- AZAD, M. A.; GAO, J.; MA, J. et al. Opportunities of prebiotics for the intestinal health of monogastric animals. **Animal Nutrition**, 2020.
- BARBA-VIDAL, E.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; CASTILLEJOS, L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. **Livestock Science**, v.223, p.84-96, 2019.
- BARTON, M. D. Impact of antibiotic use in the swine industry. **Current Opinion in Microbiology**, v.19, p.9-15, 2014.
- BOMBA, L.; MINUTI, A.; MOISÁ, S. J. et al. Gut response induced by weaning in piglet features marked changes in immune and inflammatory response. **Functional & Integrative Genomics**, v.14, n.4, p.657-671, 2014.
- BOUDRY, G.; PÉRON, V.; LE HUËROU-LURON, I. et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. **The Journal of Nutrition**, v.134, n.9, p.2256-2262, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 13, de 30 de novembro de 2004**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/IN13atualizada.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2021.
- BROWN, K.; UWIERA, R. R.; KALMOKOFF, M. L. et al. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.49, n.1, p.12-24, 2017.
- BUCHET, A.; BELLOC, C.; LEBLANC-MARIDOR, M. et al. Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. **PLoS One**, v.12, n.5, p.e0178487, 2017.
- BUCKLE, J. **Clinical aromatherapy-e-book: Essential oils in practice**. Elsevier Health Sciences, 2014.
- ČABARKAPA, I., PUVAČA, N., POPOVIĆ, S. et al. Aromatic plants and their extracts pharmacokinetics and in vitro/in vivo mechanisms of action. In: **Feed Additives**. Academic Press, 2020. p.75-88
- CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, n.1, p.1-4, 2013.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. **Lipids Essent Oils Antimicrob Agents**, v.25, p.203-38, 2011.
- CELI, P.; COWIESON, A. J.; FRU-NJI, F. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v.234, p.88-100, 2017.
- DAWIDOWICZ, A. L.; OLSZOWY, M. Do antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. **Natural Product Research**, v.28, n.22, p.1952-1963, 2014.
- DE SOUSA, D. P. (Ed.). **Bioactive Essential Oils and Cancer**. Springer, 2015.
- DEGROOTE, J.; VERGAUWEN, H.; WANG, W. et al. Changes of the glutathione redox system during the weaning transition in piglets, in relation to small intestinal morphology and barrier function. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.11, p.1-17, 2020.

- DING, S.; YAN, W.; MA, Y. et al. The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. **Animal Nutrition**, 2020.
- DONG, L.; LIU, J.; ZHONG, Z. et al. Dietary tea tree oil supplementation improves the intestinal mucosal immunity of weanling piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.255, p.114209, 2019.
- DUCATELLE, R.; EECKHAUT, V.; HAESEBROUCK, F. et al. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. **Animal**, v.9, n.1, p.43-48, 2015.
- EL KHARRAF, S.; FARAH, A.; MIGUEL, M. G. et al. Two Extraction Methods of Essential Oils: Conventional and Non-conventional Hydrodistillation. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.23, n.5, p.870-889, 2020.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina, 1–4 October 2001.
- GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.S15-S28, 2010.
- GASSLER, N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v.8, n.4, p.150, 2017.
- GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.14, n.8, p.491, 2017.
- GÓCHEZ, D.; MOULIN, G.; JEANNIN, M. et al. OIE Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals. better understanding of the global situation. Fourth report. 2020.
- GRESSE, R.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FLEURY, M. A. et al. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. **Trends in Microbiology**, v.25, n.10, p.851-873, 2017.
- GROMAN, R. P. Chapter 93 – Gram-positive infections. In: *Small Animal Critical Care Medicine*. 2.ed. W.B. Saunders, 2015. p.488-492.
- GUEVARRA, R. B.; LEE, J. H.; LEE, S. H. et al. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.10, n.1, p.1-10, 2019.
- HEO, J. M.; OPAPEJU, F. O.; PLUSKE, J. R. 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.
- HU, C. H., XIAO, K., LUAN, Z. S. et al. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. **Journal of Animal Science**, v.91, n.3, p.1094-1101, 2013.
- IFTEKHAR, A.; SIGAL, M. Defense and adaptation mechanisms of the intestinal epithelium upon infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v.311, n.3, p.151486, 2021.
- ILIJEVA, R.; BUCHBAUER, G.. Biological properties of some volatile phenylpropanoids. **Natural Product Communications**, v.11, n.10, p.1934578X1601101041, 2016.

- JAYARAMAN, B.; NYACHOTI, C. M. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. **Animal Nutrition**, v.3, n.3, p.205-211, 2017.
- JENSEN, P. Observations on the maternal behaviour of free-ranging domestic pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, v.16, n.2, p.131-142, 1986.
- KEBEDE, B. H.; FORSIDO, S. F.; TOLA, Y. B. et al. Free radical scavenging capacity, antibacterial activity and essential oil composition of turmeric (*Curcuma domestica*) varieties grown in Ethiopia. **Heliyon**, v.7, n.2, p.e06239, 2021.
- KIL, D. Y.; KWON, W. B.; KIM, B. G. Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.24, n.3, p.231-247, 2011.
- KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MÄRZ, R. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, v.66, n.6, p.495-505, 2000.
- LAXMINARAYAN, R.; VAN BOECKEL, T.; TEILLANT, "The Economic Costs of Withdrawing Antimicrobial Growth Promoters from the Livestock Sector", OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, No. 78, OECD Publishing, Paris, 2015.
- LEKAGUL, A.; TANGCHAROENSATHIEN, V.; YEUNG, S. Patterns of antibiotic use in global pig production: a systematic review. **Veterinary and Animal Science**, v.7, p.100058, 2019.
- LIAO, S. F.; NYACHOTI, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. **Animal Nutrition**, v.3, n.4, p.331-343, 2017.
- LIMA, D. S. D.; LIMA, J. C.; CALVACANTI, R. M. C. B. et al. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.8, n.1, p.17-21, 2017.
- LIU, Y.; ESPINOSA, C. D.; ABELILLA, J. J. et al. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: a review. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.113-125, 2018.
- LONG, S. F.; XU, Y. T.; PAN, L. et al. Mixed organic acids as antibiotic substitutes improve performance, serum immunity, intestinal morphology and microbiota for weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.235, p.23-32, 2018.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; LÓPEZ-ALONSO, M.; PECHOVA, A. et al. Alternatives to antibiotics and trace elements (copper and zinc) to improve gut health and zootechnical parameters in piglets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, p.114727, 2020.
- LUISE, D., CORREA, F., BOSI, P. et al. A Review of the Effect of Formic Acid and Its Salts on the Gastrointestinal Microbiota and Performance of Pigs. **Animals**, v.10, n.5, p.887, 2020.
- MA, F.; XU, S.; TANG, Z. et al. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, v.3, n.1, p.32-38, 2020.
- MANJAMALAI, A.; GRACE, V. M. Antioxidant activity of essential oils from *Wedelia chinensis* (Osbeck) in vitro and in vivo lung cancer bearing C57BL/6 mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.13, n.7, p.3065-3071, 2012.
- MCELROY, S. J.; FREY, M. R.; TORRES, B. A. et al. Innate and Mucosal Immunity in the Developing Gastrointestinal Tract. In: **Avery's Diseases of the Newborn: Tenth Edition**. 10.ed. Elsevier Inc., 2018. p.1054-1067.
- MICHIELS, J., MISSOTTEN, J., DIERICK, N. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.13, p.2371-2381, 2008.

- MOESER, A. J.; POHL, C. S.; RAJPUT, M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. **Animal Nutrition**, v.3, n.4, p.313-321, 2017.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p.1451-1474, 2013.
- O'BRYAN, C. A.; PENDLETON, S. J.; CRANDALL, P. G. et al. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—in vitro studies on antibacterial mode of action. **Frontiers in Veterinary Science**, v.2, p.35, 2015.
- OMONIJO, F. A.; NI, L.; GONG J. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.126-136, 2018.
- OUEHAND, A. C.; TIIHONEN, K.; KETTUNEN, H. et al. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **VETERINARNI MEDICINA**, v.55, n.2, p.71-78, 2010.
- PETRI, D.; HILL, J. E.; VAN KESSEL, A. G. Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. **Livestock Science**, v.133, n.1-3, p.107-109, 2010.
- PLUSKE, J. R.; TURPIN, D. L.; KIM, J. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.187-196, 2018.
- RADÜNZ, M.; DA TRINDADE, M. L. M.; CAMARGO, T. M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v.276, p.180-186, 2019.
- RODRIGUES, F. A. P.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; PRATA, M. M. G. et al. Fisiologia da barreira epitelial intestinal. In: **Sistema digestório: Integração básico-clínica**. ePuB. São Paulo: Blucher, 2016. p.441-478.
- SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. D.; COSTA, F. G. P. et al. **Nutrição de Não Ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Editora Funep, 2014. 678p.
- SCHOKKER, D.; ZHANG, J.; VASTENHOUW, S. A. et al. Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. **PloS one**, v.10, n.2, p.e0116523, 2015.
- SENTHILKUMAR, A.; THANGAMANI, A.; KARTHISHWARAN, K. et al. Essential oil from the seeds of *Moringa peregrina*: Chemical composition and antioxidant potential. **South African Journal of Botany**, v.129, p.100-105, 2020.
- SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.21, n.7, p.363-383, 2020.
- SOUCY, S. M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, v.16, n.8, p.472-482, 2015.
- STRATAKOS, A. C.; KOIDIS, A. Methods for extracting essential oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Academic Press, 2016. p.31-38.
- SU, G.; ZHOU, X.; WANG, Y. et al. Effects of plant essential oil supplementation on growth performance, immune function and antioxidant activities in weaned pigs. **Lipids in Health and Disease**, v.17, n.1, p.1-10, 2018.
- THACKER, P. A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, n.1, p.1-12, 2013.
- TIAN, Q.; PIAO, X. Essential oil blend could decrease diarrhea prevalence by improving antioxidative capability for weaned pigs. **Animals**, v.9, n.10, p.847, 2019.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v.79, n.7, p.R1231-R1249, 2014.
- TORRENT, J. **Óleos Funcionais: Uma Alternativa como Promotor de Crescimento**. Boletim Apamvet – Nutrição Animal, 2014. p.20-21.

- TRCKOVA, M.; FALDYNA, M.; ALEXA, P. et al. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.92, n.2, p.767-774, 2014.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE - USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. 2021. p.1-18.
- VALDIVIESO-UGARTE, M.; PLAZA-DIAZ, J.; GOMEZ-LLORENTE, C. et al. In vitro examination of antibacterial and immunomodulatory activities of cinnamon, white thyme, and clove essential oils. **Journal of Functional Foods**, v.81, p.104436, 2021.
- VERDILE, N.; MIRMAHMOUDI, R.; BREVINI, T. A. L. et al. Evolution of pig intestinal stem cells from birth to weaning. **Animal**, v.13, n.12, p.2830-2839, 2019.
- WANG, H., XU, R., ZHANG, H. et al. Swine gut microbiota and its interaction with host nutrient metabolism. **Animal Nutrition**, 2020.
- WANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, X. et al. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. **Journal of Functional Foods**, v.75, p. 104248, 2020.
- WARNECKE, T.; GILL, R. T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. **Microbial Cell Factories**, v.4, n.1, p.1-8, 2005.
- WEI, H. K.; XUE, H. X.; ZHOU, Z. et al. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v.11, n.2, p.193-201, 2017.
- WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v.86, n.suppl_14, p.E140-E148, 2008.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE. **Terrestrial Animal Health Code**, 28.ed. Paris: OIE, 2019.
- XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, n.3, p.174-179, 2008.
- YANG, F.; HOU, C.; ZENG, X. et al. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. **Pathogens**, v.4, n.1, p.34-45, 2015.
- ZAMBELL, K. L.; FITCH, M. D.; FLEMING, S. E. Acetate and butyrate are the major substrates for de novo lipogenesis in rat colonic epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, v.133, n.11, p.3509-3515, 2003.
- ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v.10, n.1, p.18-26, 2017.
- ZHAO, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, S. et al. The role of lactose in weanling pig nutrition: a literature and meta-analysis review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.12, n.1, p.1-17, 2021.
- ZUO, L.; KUO, W. T.; TURNER, J. R. Tight junctions as targets and effectors of mucosal immune homeostasis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v.10, n.2, p.327-340, 2020.

3 BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA AOS ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA DIETA DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de um *blend* de OE sobre o desempenho zootécnico, ocorrência de diarreia (OD), perfil hematológico e bioquímico sanguíneo, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, peso relativo, comprimento, e pH do conteúdo de órgãos, e *status* antioxidante hepático, de leitões em fase de creche, como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho convencionais. Foram utilizados 135 leitões machos inteiros, com peso corporal inicial médio de $7,09 \pm 0,29$ kg, distribuídos, por um delineamento experimental em blocos casualizados, em cinco tratamentos, com nove repetições de três leitões na unidade experimental. Os tratamentos foram compostos por uma dieta basal controle (CN), CN + 125 mg/kg enramicina 8%, como antimicrobiano melhorador de desempenho, (AMD), CN + 100, 200 e 400 mg/kg do *blend* de OE composto por timol, cinamaldeído, D-limoneno e carvacrol (OE100; OE200; OE400). Dos resultados de desempenho zootécnico, na fase inicial II, a eficiência alimentar foi melhor para os tratamentos OE400 e OE200, quando comparados ao OE100 ($p < 0,05$). Durante o período total, o OE400 foi mais eficaz no controle da OD que o CN e o OE100 ($p < 0,05$). Entre as variáveis sanguíneas, na fase pré-inicial II, foram observados valores menores ($p < 0,05$) de proteínas totais para o CN. Ainda, o CN apresentou menor valor de proteínas plasmáticas quando comparado ao AMD, e o OE100 apresentou menor volume corpuscular médio (VCM) que o OE400 ($p < 0,05$). Na fase inicial II, foram observados maior VCM e menor hemoglobina corpuscular média e hemácias para o OE400 quando comparado ao OE100 ($p < 0,05$). Nessa mesma fase, foram obtidos níveis mais altos de bastonetes para o AMD, OE400 e OE200 ($p < 0,05$). A adição de AMD e OE às dietas aumentou ($p < 0,05$) a atividade hepática da enzima antioxidante superóxido dismutase. Os demais parâmetros avaliados não foram influenciados ($p > 0,05$) pelos tratamentos. Em conclusão, a adição do *blend* de OE às dietas de leitões em fase de creche foi capaz de influenciar positivamente a OD, perfil hematológico e bioquímico sanguíneo, e o *status* antioxidante hepático dos animais, sem prejudicar o desempenho zootécnico, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos, podendo ser utilizado como alternativa aos AMD convencionais.

Palavras-chave: aditivo fitogênico, antimicrobiano, ocorrência de diarreia, superóxido dismutase.

BLEND OF ESSENTIAL OILS AS AN ALTERNATIVE FOR ANTIMICROBIAL GROWTH PROMOTERS IN DIETS FOR WEANING PIGS

ABSTRACT – The aim of this study was to investigate the effects of an EO blend on growth performance, occurrence of diarrhea (OD), hematological and blood biochemical profile, intestinal morphometry, morphology and microbiology, relative weight, length, and pH of the content of organs, and hepatic antioxidant status of weaning pigs, as an alternative to conventional AGP. One hundred and thirty-five crossbred entire male piglets, with an average initial body weight of 7.09 ± 0.29 kg were divided based on a randomized block design into five treatments, with nine replicates of three piglets per experimental unit. Treatments were a negative control diet (NC), NC + 125 mg/kg of enramycin 8%, as antimicrobial growth promoter (AGP), NC + 100, 200 and 400 mg/kg of the EO blend composed of thymol, cinnamaldehyde, D-limonene and carvacrol (EO100; EO200; EO400). The results obtained for growth performance, in the initial phase II, showed the FE was better for treatments EO400 and EO200, when compared to EO100 ($p < 0.05$). During the total period, OE400 was more effective in controlling OD than NC and EO100 ($p < 0.05$). Among the blood variables, in the pre-starter II phase, lower values of total proteins were observed for NC ($p < 0.05$). Furthermore, NC had a lower value of plasma proteins when compared to AGP, and EO100 had a lower mean corpuscular volume (MCV) than EO400 ($p < 0.05$). In the starter II phase, higher MCV and lower mean corpuscular hemoglobin and red blood cells were observed for EO400 when compared to EO100 ($p < 0.05$). In this same phase, higher levels of band neutrophils were obtained for AGP, EO400 and EO200 ($p < 0.05$). The addition of AGP and EO to the diets increased ($p < 0.05$) the hepatic activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase. The other parameters evaluated were not influenced ($p > 0.05$) by the dietary treatments. In conclusion, the addition of the EO blend to the diets of weaning piglets was able to positively influence the OD, hematological and blood biochemical profile, and the hepatic antioxidant status of the animals, without any impair to the growth performance, intestinal morphometry, morphology and microbiology, relative weight, length, and pH of the content of organs, showing that it can be used as an alternative to conventional AMD.

Keywords: antimicrobial, occurrence of diarrhea, phytogetic additive, superoxide dismutase.

3.1. INTRODUÇÃO

A fase pós-desmame é a mais crítica na produção de suínos, uma vez que o leitão é submetido a transição de uma dieta líquida, a base de leite materno, para uma dieta sólida, enquanto seu trato gastrointestinal (TGI) apresenta funções digestória e imune limitadas. Ainda, fatores estressores, como a separação de sua mãe, transporte e novas interações sociais e ambientais, tornam esse período ainda mais desafiador (COLSON *et al.*, 2012). Em razão disso, esta é a etapa da vida em que mais são utilizadas ferramentas para preservar a saúde intestinal desses animais (LEKAGUL *et al.*, 2019).

Desordens intestinais que afetam negativamente o desempenho zootécnico são comuns em suínos jovens e podem ser agravadas pela presença de microrganismos patogênicos (HEO *et al.*, 2013). Na busca por amenizar essas desordens e otimizar a produtividade dos leitões, os antimicrobianos são utilizados como melhoradores de desempenho (AMD), adicionados a dieta em doses subterapêuticas e de maneira contínua. No entanto, há algumas décadas o uso desses antibióticos tem sido fortemente questionado (LEKAGUL *et al.*, 2019).

Durante o período pré-desmame, o TGI dos suínos é povoado principalmente por bactérias lácticas, as quais beneficiam o equilíbrio intestinal. Contudo, a suspensão do aleitamento e a introdução da nova forma de alimento causa redução abrupta dessa população. O uso de AMD, promove alterações na composição da microbiota intestinal, pois, de maneira geral, possuem amplo espectro de atuação, inibindo o crescimento de bactérias benéficas e patogênicas. Essa associação de fatores prejudica a saúde intestinal e facilita o aparecimento de patógenos oportunistas, como a enterobactéria *Escherichia coli*, um dos principais agentes causadores de diarreia pós-desmame (GRESSE *et al.*, 2017).

Outros pontos que têm levado à busca por alternativas aos AMD, é a preocupação frente ao uso indiscriminado desses agentes, a presença de seus resíduos nos produtos de origem animal e no meio ambiente, além do surgimento de bactérias resistentes, com potencial de causar doenças em animais e humanos (MA *et al.*, 2020).

No Brasil, o uso de colistina e tiamulina como AMD foi proibido (CARDINAL *et al.*, 2021), causando aumento no uso de outras substâncias que ainda estão liberadas, como a enramicina. A enramicina é um polipeptídeo proveniente da fermentação de *Streptomyces fungidicus* e possui potencial de ação antimicrobiano sobre bactérias Gram-positivas, como o patógeno *Clostridium perfringens* (NGOH *et al.*, 2018).

Apesar disso, a pressão para banimento completo do uso de AMD é crescente. Para acompanhar essa mudança nos padrões regulatórios e dos consumidores, pesquisas têm

avaliado alternativas, dentre as quais estão os aditivos alimentares fitogênicos (LÓPEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2020).

Os fitogênicos são substâncias derivadas de plantas que, de acordo com Windisch *et al.* (2008), podem ser classificados quanto a sua origem ou processamento em ervas, especiarias, óleos essenciais (OE) (extraídos por expressão a frio ou por destilação a vapor ou álcool).

Os OE são compostos voláteis naturais, com característica lipofílica, provenientes do metabolismo secundário das plantas (WEI *et al.*, 2020). Possuem potencial antimicrobiano, devido sua capacidade de causar alterações na estrutura da membrana celular de bactérias. Ainda, são capazes de modular a resposta imune nos tecidos animais, por meio da ativação de proteínas celulares responsáveis pela liberação de substâncias inflamatórias e antioxidantes, além de estimular a secreção de enzimas digestivas pelo epitélio do TGI (OMONIJO *et al.*, 2018).

Estudos sugerem que quando administrados oralmente, na forma não encapsulada, os OE são rapidamente absorvidos pelo TGI, principalmente no estômago e início do intestino delgado, com meia vida de aproximadamente duas horas. Em seguida, permeiam os tecidos corporais por meio da circulação sanguínea e a maior parte é metabolizada pelos rins e excretada na urina, com baixa possibilidade de acúmulo nos tecidos animais (KOHLERT *et al.*, 2000; MICHIELS *et al.*, 2008).

Neste contexto, foi definida a hipótese de que os OE poderiam ser utilizados como alternativa aos AMD convencionais na alimentação de leitões em fase de creche beneficiando o desempenho zootécnico, saúde intestinal e o estresse oxidativo dos animais. Assim, o estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos de um *blend* de OE sobre o desempenho zootécnico, ocorrência de diarreia (OD), perfil hematológico e bioquímico sanguíneo, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, peso relativo, comprimento, e pH do conteúdo de órgãos, e *status* antioxidante hepático, de leitões em fase de creche, como alternativa aos AMD convencionais.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Local, animais, alojamento e delineamento experimental

O protocolo de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) sob o Certificado de número 02/2020-CEUAP. O experimento foi conduzido nas instalações do Setor de Suinocultura da Fazenda Experimental Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa (Linha Guará), da Unioeste.

Um total de 135 leitões machos inteiros, híbridos de linhagem comercial (Landrace × Large White, Agroceres[♂] e DanBred[♀]), com peso corporal inicial médio de $7,09 \pm 0,29$ kg, desmamados aos 25 dias de idade, foram distribuídos em um delineamento experimental em blocos casualizados, constituindo cinco tratamentos, repetidos três vezes no tempo, totalizando nove repetições, com três leitões por unidade experimental.

Os leitões foram pesados, identificados individualmente com brincos de plásticos, e alojados em galpão de alvenaria, em baias suspensas ($1,54 \text{ m}^2$) com piso de plástico polietileno vazado, dispostas em duas fileiras divididas por um corredor central, equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros tipo chupeta. As baias e a instalação eram limpas diariamente, no período da tarde, com água corrente, para manter a higiene do ambiente.

No interior do galpão, a temperatura ambiente (°C) e umidade relativa (%) do ar foram verificadas com o auxílio de um *datalogger* (modelo UT330B digital USB, marca UNI-T, Pequim, China), instalado na parte central à altura das baias. A ventilação do galpão foi realizada com o auxílio de ventiladores, exaustores e janelas de vidro do tipo basculante. O aquecimento das baias experimentais foi realizado com o uso de lâmpadas incandescentes infravermelhas individuais, presentes na parte superior de cada baia. As médias de temperatura e umidade relativa observadas durante o experimento foram $25,20 \text{ °C} \pm 4,28 \text{ °C}$ e $88,19 \% \pm 20,63 \%$, respectivamente.

O período experimental teve duração de 42 dias. No décimo quarto dia de alojamento os animais receberam a segunda dose das vacinas imunizantes contra os agentes patogênicos Circovírus suíno tipo 2, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* sorotipo 2 e *Haemophilus parasuis*.

3.2.2. Dietas experimentais

As dietas foram compostas por cinco tratamentos, sendo: dieta basal controle (CN), CN adicionada de 125 mg do antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8% por kg de ração (AMD), CN adicionada de 100 (OE100), 200 (OE200), e 400 mg (OE400) do *blend* de OE por kg de ração.

O *blend*, composto em 10% por timol, 10% por cinamaldeído, 10% por D-limoneno, 7,5% por carvacrol e 62,5% por farelo de arroz, como veículo, foi obtido da empresa Tectron (Toledo, Paraná, Brasil). As quantidades adicionadas do AMD e do *blend* foram descontadas na inclusão do milho moído, com o propósito de manter o padrão nutricional entre os tratamentos.

As dietas basais foram divididas em quatro fases experimentais, pré-inicial I (de 7,09 a 9,60 kg de peso corporal), pré-inicial II (de 9,60 a 14,15 kg), inicial I (de 14,16 a 18,97 kg) e inicial II (de 18,97 a 23,83 kg), as quais foram formuladas a base de milho e farelo de soja, próximas aos limites das exigências nutricionais estabelecidas por Rostagno *et al.* (2017), e fornecidas aos leitões na forma farelada. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água durante todo o período experimental. A composição centesimal e as composições analisada e calculada das dietas basais estão dispostas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Composição centesimal das dietas basais experimentais (como base alimentada)

Ingredientes (%)	Dietas Basais			
	Pré I	Pré II	Ini I	Ini II
Milho moído, 7,6%	35,50	43,50	50,00	65,50
Milho pré-gelatinizado, 8,0%	16,41	12,11	6,54	1,19
Farelo de soja, 46%	12,00	14,00	18,00	22,50
Farinha de soja micronizada, 39%	5,00	4,00	3,00	2,00
Farinha de peixe, 65%	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo soja	2,50	2,50	2,00	2,00
Leite em pó	11,50	8,50	8,00	-
Soro de leite	10,00	8,50	6,00	-
Glutamato monossódico	0,010	0,010	0,010	0,010
Açúcar refinado	1,000	1,000	1,000	1,000
Sal comum	0,500	0,500	0,500	0,500
Calcário calcítico	0,308	0,347	0,233	0,391
Fosfato bicálcico	0,698	0,529	0,533	0,691
L-Lisina, 80%	0,569	0,540	0,395	0,443
DL-Metionina, 98%	0,267	0,242	0,159	0,147
L-Treonina, 98%	0,299	0,289	0,236	0,246
L-Triptofano, 98%	0,099	0,091	0,065	0,066
L-Valina, 98%	0,050	0,040	0,030	0,020
Adsorvente de micotoxinas	0,100	0,100	0,100	0,100
Pré-mistura mineral ¹	0,050	0,050	0,050	0,050
Pré-mistura vitamínica ²	0,025	0,025	0,025	0,025
Cloreto de colina 60%	0,050	0,050	0,050	0,050
Sulfato cobre mono 35%	0,035	0,035	0,035	0,035
B.H.T.	0,025	0,025	0,025	0,025
Fitase ³	0,010	0,010	0,010	0,010

B.H.T., hidroxitolueno butilado;

¹Pré-mistura mineral (conteúdo por kg de produto): zinco (óxido de zinco), 160 g; manganês (monóxido de manganês), 120 g; ferro (sulfato de ferro), 120 g; cobre (sulfato de cobre), 20 g; iodo (iodato de cálcio), 2.000 mg; ²Pré-mistura vitamínica (conteúdo por kg de produto): vitamina A, 28.800 KUI; vitamina D₃, 6.400 KUI; vitamina E, 78.933 UI; vitamina K₃, 12,80 g; vitamina B₁, 6.400 mg; vitamina B₂, 16 g; vitamina B₁₂, 64.000 mcg; niacina, 128 g; ácido pantotênico, 64 g; ácido fólico, 1.980 mg; biotina, 640 mg; selênio (selenito de sódio), 1.200 mg.

³Fitase, 5.000 U/g.

Tabela 2. Composição calculada e analisada das dietas basais experimentais

Item	Dietas Basais			
	Pré I	Pré II	Ini I	Ini II
Composição calculada				
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.600	3.550	3.500	3.450
Proteína bruta (%)	18,00	18,00	19,00	19,00
Lactose (%)	10,12	8,16	6,46	-
Lisina dig. (%)	1,35	1,30	1,25	1,20
Metionina + cistina dig. (%)	0,78	0,75	0,70	0,67
Treonina dig. (%)	0,84	0,82	0,79	0,78
Triptofano dig. (%)	0,27	0,26	0,25	0,24
Valina dig. (%)	0,63	0,64	0,68	0,73
Composição Analisada				
Proteína bruta (%)	18,95	18,76	19,46	19,30
Extrato etéreo (%)	6,73	7,99	6,87	5,84
Fibra bruta (%)	1,73	1,67	1,99	2,16
FDA (%)	2,28	3,32	4,40	2,96
FDN (%)	6,89	6,56	8,47	8,99
Matéria mineral (%)	4,65	4,37	4,34	4,23
Cálcio total (%)	0,68	0,68	0,63	0,70
Fósforo total (%)	0,58	0,52	0,55	0,52
Lactose (%)	12,70	10,81	7,57	-

Dig., digestível; FDA, fibra em detergente ácido; FDN, fibra em detergente neutro.

3.2.3. Desempenho zootécnico e ocorrência de diarreia (OD)

Para avaliação do desempenho zootécnico dos animais foram verificados o peso corporal final médio (PCF) (kg), ganho de peso corporal diário médio (GPCDM) (kg/dia), consumo de ração diário médio (CRDM) (kg/dia), e eficiência alimentar (EA) (kg/kg). Com o auxílio de uma balança digital (Modelo UL-50, Marca DIGI-TRON, Curitiba, Brasil), os suínos foram pesados ao início e ao final de cada fase, bem como a quantidade de ração fornecida diariamente e as sobras. O GPCDM foi calculado considerando o peso corporal individual de cada animal dividido pelos dias de duração de cada fase. O CRDM foi determinado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida e a sobra diária, também, para cada fase. A EA foi calculada pela razão entre o ganho de peso corporal e o consumo de ração.

A ocorrência de diarreia (OD) foi avaliada durante todo o experimento. Às 10 horas da manhã de cada dia, foram observadas as fezes dos animais de cada tratamento, para as quais foram atribuídas escores de 0 a 3, de acordo com a sua aparência física, conforme descrito por

Huang *et al.* (2004). Os critérios para escores foram: 0 para fezes sólidas; 1 para fezes pastosas; 2 para fezes líquidas/pastosas; 3 para fezes líquidas. Ao término do experimento, os dados foram transformados em valores binários, onde os escores 0 e 1 foram transformados em valor 0 = ausência de diarreia, e os escores 2 e 3 foram transformados em valor 1 = ocorrência de diarreia. Posteriormente, foi calculada a frequência de ocorrência de diarreia para cada tratamento em cada fase, por meio da soma dos valores representando ocorrência de diarreia dividida pelo número total de observações para cada tratamento, multiplicado por 100 %. Os resultados foram apresentados como percentuais (%).

3.2.4. Perfil hematológico e bioquímico sanguíneo

Para realizar as análises bioquímicas sanguíneas de albumina (ALBM), proteínas totais (PT), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia (URE), glicose (GLI), e o hemograma completo, ao final dos períodos pré-inicial II e inicial II, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 08 a 10 horas. Um total de 18 leitões de cada tratamento foram selecionados, ao fim da fase pré-inicial II, para colheita sanguínea. O critério para seleção foi o peso corporal próximo ao da média da repetição, sendo que os mesmos animais foram utilizados para a colheita ao fim da fase inicial II.

Foram colhidos \pm 20 mL de sangue via punção da veia cava cranial anterior, utilizando-se seringas de 20 mL e agulhas de calibre 0,70x30 mm. O sangue obtido de cada animal foi adicionado a tubos de vidro, devidamente identificados, contendo anticoagulante EDTA para hemograma completo, fluoreto de sódio para GLI, heparina para URE, ALT e FA, e sem anticoagulante para ALB e PT. Os tubos foram alocados em uma caixa de isopor com gelo seco para posterior envio ao laboratório.

As amostras sanguíneas para avaliação do perfil hematológico foram enviadas ao laboratório clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (Palotina-PR, Brasil), onde foram submetidas a um analisador hematológico automático (Modelo bs 120, Marca Mindray, Shenzhen, China) para a quantificação de hemácias (HM), hemoglobina (HG), hematócrito (HT), leucócitos totais, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, plaquetas, proteínas plasmáticas (PP), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM).

As amostras sanguíneas para avaliação do perfil bioquímico foram centrifugadas (centrífuga analógica 80-2B, Centrilab) à 3.000 rpm por um período de 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante (± 3 mL) presente em cada tubo foi transferido para microtubos de polietileno tipo Eppendorf, em duplicatas, que passaram a ser armazenados em freezer a -20 °C. As análises de albumina (método colorimétrico), proteínas totais (método colorimétrico), ALT (método cinético), fosfatase alcalina (método cinético-colorimétrico), ureia (método enzimático-colorimétrico) e glicose (método enzimático-colorimétrico) foram determinadas por espectrofotometria (modelo Bel SPECTRO S05, marca Bel Engineering, Monza, Itália) por meio de kits comerciais da marca Gold Analisa Diagnóstica[®], no laboratório de análises sanguíneas da Unioeste.

3.2.5. Microbiologia intestinal

Ao final do período experimental, após a pesagem dos animais, foram selecionados seis leitões de cada tratamento, com peso corporal de, aproximadamente, 24 kg, próximo à média final da fase, para abate e colheita do conteúdo digestório. Os animais foram abatidos em frigorífico comercial, posterior a um período de jejum de 08 - 10 horas. Todos os procedimentos de eutanásia foram realizados por eletronarcolese, em conformidade com a Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018 do CONCEA, que estabelece as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Para avaliação da população de bactérias ácido lácticas (BAL), *Clostridium* sulfito redutores (CSR) e enterobactérias (ETB), foram colhidas amostras do conteúdo do jejuno, íleo e cólon. Para avaliação da população de *E. coli* foram colhidas amostras do conteúdo do ceco dos animais, as quais foram acondicionadas em recipientes plásticos esterilizados e individualmente identificados.

Os recipientes para realização da contagem da população de *E. coli* foram encaminhados para o laboratório comercial Mercolab (Cascavel-PR, Brasil). O método utilizado foi o de contagem em placas, com base no descrito na ISO 16649-2:2001. Os dados obtidos foram transformados em log 10.

Os demais recipientes foram encaminhados ao laboratório de microbiologia da Unioeste, onde foi pesada 1g de cada amostra para diluição seriada em água peptonada a 1%. Cada diluição foi homogeneizada utilizando-se um agitador vórtex por cerca de 30 segundos.

Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi utilizada para inoculação em superfície ao ágar eosina azul de metileno (EMB), para ETB, e 1 mL para inoculação em profundidade aos ágar triptose sulfito cicloserina (TSC), para CSR, e de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para BAL.

Após a inoculação do material nas placas de Petri de vidro, esterilizadas, foi realizada a incubação em estufa (Eletrolab) a 37 °C sob aerobiose durante 24 horas, para Enterobactérias, e a 37 °C sob anaerobiose durante 48 horas, para CSR e BAL, com base na metodologia de da Silva *et al.* (2017).

Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características presentes em cada placa, o número foi multiplicado pela respectiva diluição e então transformado em Log10 para cálculo da média de cada população.

3.2.6. Morfometria e morfologia intestinal

Amostras de ± 3 cm foram colhidas do jejuno, íleo e cólon dos animais abatidos para avaliação da morfometria e morfologia desses tecidos. As amostras de jejuno foram colhidas contando-se 150 cm da junção ileocecal, no sentido cranial. As amostras de íleo foram colhidas à 15 cm da junção ileocecal, no sentido cranial, e as de cólon foram retiradas contando-se 100 cm da junção ileocecal, no sentido caudal. Os fragmentos foram lavados com solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) e estocados em recipientes plásticos esterilizados, contendo solução de formalina tamponada a 10%.

O material foi enviado ao laboratório comercial Mercolab (Cascavel-PR, Brasil), onde foi realizado o processamento em parafina, coloração com hematoxilina e eosina, e preparação das lâminas, segundo método descrito por Prophet *et al.* (1994).

Para avaliação da morfometria, foram mensuradas a altura de 10 vilosidades (AV) e a profundidade das 10 respectivas criptas (PC) em cada fragmento intestinal para cálculo do valor médio para cada animal, e posterior cálculo da relação AV:PC. A metodologia utilizada como base foi a descrita por Kisielinski *et al.* (2002).

Na avaliação referente a morfologia foram observadas as características de infiltrado, congestão, descamação, coccidiose, grumos bacterianos, bastonetes, cistos, muco, necrose e edema. A metodologia utilizada como base foi a descrita por Kraieski *et al.* (2017).

Todas as análises foram realizadas por meio de um microscópio óptico (modelo CX31RTSF, marca Olympus, Tóquio, Japão) e sistema computacional ToupView x86.

3.2.7. Peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos

Imediatamente após o abate, os conteúdos do estômago, jejuno, íleo, ceco e cólon dos animais foram coletados e individualmente acondicionados em potes plásticos para avaliação do pH, que foi realizada com o auxílio de um medidor de pH digital (modelo TEC-2 mp, marca TECNAL, Piracicaba, Brasil). Posteriormente, o estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon e reto) vazios, e o fígado, foram pesados em balança digital (modelo MX-111, marca Maxon, China).

Os comprimentos dos intestinos delgado e grosso foram mensurados por meio de uma fita métrica comum. Os órgãos não digestórios, como coração, baço e rins, também foram pesados. A partir das medidas obtidas foram calculados os pesos relativos, levando em consideração o peso corporal do respectivo animal abatido.

3.2.8. *Status* antioxidante hepático

Amostras de ± 2 g do fígado dos leitões abatidos, foram colhidas e acondicionadas em microtubos de polietileno tipo Eppendorf e imediatamente submetidas à temperatura de -20°C , para posterior armazenamento em ultra freezer (modelo CL580-86V, marca ColdLab, Piracicaba, Brasil) a -80°C . As amostras foram embaladas em caixa de isopor contendo dióxido de carbono sólido, para conferir baixa temperatura, e transportadas até o laboratório comercial onde foi realizada a quantificação do peptídeo glutathiona (GSH) e das enzimas glutathiona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e, proteínas hepáticas (PH).

No laboratório, os fragmentos de fígado foram homogeneizados em solução tampão fosfato de potássio com pH 6,5, a uma diluição de 1:10 para GSH, SOD, CAT, e PH, e diluição de 1:30 para GST. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (microcentrífuga refrigerada modelo NT 805, marca Nova Técnica, Piracicaba, Brasil) a velocidade de 10000 giros durante 20 minutos, sob temperatura de 4°C .

A atividade da CAT foi quantificada de acordo com Aebi (1984). A reação foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) na presença da proteína citosólica, e monitorizada por 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (modelo Synergy HT, marca Biotek, Winooski, EUA), utilizando o coeficiente de extinção de 41 mM/cm.

A atividade de SOD foi quantificada por meio da capacidade dessa enzima presente no tecido em inibir a auto oxidação do reagente pirogallol (GAO *et al.*, 1998). Para esta reação, 60 µL de cada amostra homogeneizada foi adicionada a solução contendo 1.327,5 µL de tampão Tris HCl (0,4M, pH 8,9), e, em seguida, agitadas com auxílio de um agitador em vórtex (modelo QL-901, marca Biomixer, Rancho Cucamonga, EUA). Às misturas foram adicionados 75 µL de solução com pirogallol 15 mM. e após incubação de 30 minutos, em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 37,5 µL de solução de HCl 1N. A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 440 nm. A quantidade de enzima que inibiu a reação em 50% (IC50) foi definida como uma unidade de SOD, e a atividade da enzima expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína total (U SOD/mg de proteína).

Para a análise de GST, 200 µL de solução-reação contendo 3 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), diluído em etanol PA, e 3 mM de GSH, diluída em tampão fosfato de potássio, foram adicionadas a 100 µL de sobrenadante. O aumento linear da absorbância a 340 nm foi monitorado, utilizando o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar/cm. As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH (glutationa na forma reduzida), formando um tioéter que pode ser monitorizado pelo aumento de absorbância, conforme método de Habig *et al.* (1974).

Os níveis de GSH foram medidos pela técnica de Sedlak e Lindsay (1968), sendo que 100 µL do homogenato das amostras foram homogeneizados a 80 µL de ácido tricloroacético (grau de pureza 12.5%). O sobrenadante foi separado por centrifugação a 6000 rpm, durante 15 min a 4°C. Em seguida, 20 µL do sobrenadante foram misturados a 280 µL de tampão Tris HCl (0,4 M, pH 8,9) e 5 µL de ácido 5,5'-ditiobi-2-nitrobenzóico em metanol. A absorbância da solução foi medida a 415 nm no leitor de microplacas, usando GSH conhecido como padrão externo.

A quantificação de PH nas amostras foi feita utilizando albumina bovina como padrão, de acordo com Bradford (1976). Foram utilizados 10 µL de cada amostra já homogeneizada em cada poço da microplaca, que reagiram com 250 µL de solução de Bradford. A leitura foi realizada em leitor de microplaca, a 595 nm. O valor de PH obtido foi utilizado para o cálculo dos parâmetros anteriores, expressos em mg de proteína nos homogenatos de fígado.

3.2.9. Análise estatística

Com o intuito de identificar *outliers* baseados na curva de distribuição normal, foi empregada a análise dos resíduos padronizados de Student (RStudent), sendo que valores de RStudent maiores ou iguais a três desvios-padrão foram considerados como influentes.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos erros experimentais e o teste de Levene foi utilizado para avaliar a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos. A não influência ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o PCI dos animais, para a indicação como covariável e correção dos valores de médias observadas, foi verificada por meio da ANOVA.

Posteriormente, os efeitos das classes de tratamentos experimentais sobre as variáveis dependentes de desempenho zootécnico, perfil bioquímico sanguíneo, morfometria e microbiologia intestinal, *status* antioxidante hepático, biometria e pH de órgãos foram verificados através da ANCOVA ou ANOVA.

Para os dados de OD, morfologia intestinal e perfil hematológico, o Modelo Linear Generalizado (MLG) foi ajustado em cada distribuição e função de ligação, e a significância dos efeitos associados aos tratamentos foi verificada por meio da análise do tipo III. O Critério de Informação de Akaike (AIC) foi utilizado para avaliar a qualidade de ajuste do modelo.

O teste de Student-Newman-Keuls (SNK) e o teste t de Student foi utilizado para comparação entre os pares de médias dos tratamentos para desempenho zootécnico. Para perfil bioquímico sanguíneo, morfometria e microbiologia intestinal, *status* antioxidante hepático, biometria e pH de órgãos foi aplicado o teste de SNK. O teste de Tukey foi empregado para realizar as comparações entre as médias para a OD, morfologia intestinal e perfil hematológico.

A significância foi declarada com probabilidade de 5%. Os dados foram apresentados como médias. As análises foram realizadas utilizando-se o software “*SAS University Edition*” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Desempenho zootécnico e ocorrência de diarreia (OD)

Os resultados de desempenho zootécnico (Tabela 3), demonstram que na fase inicial II, os animais do OE400 e OE200 apresentaram melhores valores de EA, 0,65 e 0,64, respectivamente, quando comparados ao OE100, com 0,59 ($p=0,047$). As demais variáveis não apresentaram diferença ($p>0,05$).

Os resultados referentes a OD (Tabela 4) demonstraram que houve efeito ($p\leq 0,05$) dos tratamentos sobre essa variável em diferentes fases. Na pré-inicial I, foram obtidos valores menores de OD para o OE400 e o CN, quando comparados ao OE100 ($p=0,013$). Na pré-inicial II, o OE400 resultou em menor OD (37,37 %), com resultado semelhante apenas ao AMD (42,42 %) ($p=0,041$).

Com relação a fase inicial I, não houve influência dos tratamentos ($p>0,05$). Já na fase inicial II, em relação a ambos o OE100 e ao CN, a menor OD foi obtida para o OE400, com 31,88 % ($p<0,0001$). No período total, os animais alimentados com OE400 apresentaram redução de 15,74 % e 21,88 % na OD em relação aos que receberam CN e OE100 ($p<0,0001$), respectivamente.

Tabela 3. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o desempenho zootécnico de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Pré-inicial I (7,09 a 9,60 kg)							
PCI	7,06	7,10	7,10	7,10	7,10	-	-
CRDM	0,259	0,281	0,264	0,246	0,275	0,006	0,359
GPCDM	0,169	0,185	0,174	0,159	0,192	0,005	0,361
PCF	9,48	9,74	9,58	9,33	9,85	0,096	0,287
EA	0,65	0,66	0,66	0,65	0,70	0,012	0,638
Pré-inicial II (9,60 a 14,15 kg)							
CRDM	0,563	0,605	0,586	0,565	0,587	0,010	0,866
GPCDM	0,394	0,434	0,420	0,398	0,427	0,008	0,659
PCF	13,83	14,51	14,20	13,68	14,52	0,160	0,664
EA	0,70	0,72	0,72	0,70	0,73	0,006	0,448
Inicial I (14,16 a 18,97 kg)							
CRDM	0,884	0,937	0,901	0,868	0,884	0,014	0,502
GPCDM	0,642	0,661	0,631	0,616	0,634	0,011	0,602
PCF	18,73	19,72	18,98	18,45	19,36	0,187	0,539
EA	0,73	0,70	0,70	0,71	0,72	0,006	0,548
Inicial II (18,97 a 23,83 kg)							
CRDM	1,004	1,026	1,033	1,020	1,028	0,014	0,601
GPCDM	0,627	0,622	0,610	0,654	0,664	0,009	0,081
PCF	23,54	24,14	23,62	23,43	24,41	0,231	0,129
EA	0,63 ^{ab}	0,61 ^{ab}	0,59 ^b	0,64 ^a	0,65 ^a	0,007	0,047
Período total (7,09 a 23,83 kg)							
CRDM	0,599	0,625	0,614	0,587	0,614	0,008	0,676
GPCDM	0,405	0,419	0,406	0,402	0,426	0,005	0,575
PCF	23,54	24,14	23,62	23,43	24,41	0,230	0,578
EA	0,68	0,67	0,66	0,68	0,70	0,004	0,124

EPM, erro padrão da média; PCI, peso corporal inicial; CRDM, consumo de ração diário médio; GPCDM, ganho de peso diário médio; PCF, peso corporal final; EA, eficiência alimentar;

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

Médias, na mesma linha, com diferentes letras sobrescritas diferiram estatisticamente pelo teste t de Student (p<0,05).

Tabela 4. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre a ocorrência de diarreia (OD) em leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400	
Pré-inicial I (7,09 a 9,60 kg)						
OD (%)	75,19 ^b	77,52 ^{ab}	88,37 ^a	79,84 ^{ab}	73,64 ^b	0,013
Pré-inicial II (9,60 a 14,15 kg)						
OD (%)	52,53 ^a	42,42 ^{ab}	55,56 ^a	52,53 ^a	37,37 ^b	0,041
Inicial I (14,15 a 18,97 kg)						
OD (%)	36,23	26,09	28,99	31,88	40,58	0,351
Inicial II (18,97 a 23,83 kg)						
OD (%)	60,87 ^{ab}	42,03 ^{abc}	63,77 ^a	39,13 ^{bc}	31,88 ^c	<0,0001
Período total (7,09 a 23,83 kg)						
OD (%)	59,02 ^{ab}	51,64 ^{bc}	63,66 ^a	55,74 ^{abc}	49,73 ^c	<0,0001

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

Médias, na mesma linha, com diferentes letras sobrescritas diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.3.2. Perfil hematológico e bioquímico

Dos resultados obtidos pelas análises bioquímicas sanguíneas (Tabela 5), houve diferença (p=0,004) apenas para a variável proteínas totais, na fase pré-inicial II, sendo a menor concentração obtida para os animais do CN (3,96 g/dL), diferindo dos demais tratamentos.

Tabela 5. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o perfil bioquímico sanguíneo de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Pré-inicial II (14,15 kg)							
ALBM, g/dL	1,87	1,81	1,74	1,84	1,80	0,055	0,718
ALT, U/L	67,86	59,59	62,87	53,72	64,42	3,729	0,202
FA, U/L	276,40	276,04	302,48	282,89	267,12	7,660	0,630
GLI, mg/dL	109,63	120,27	112,15	116,97	113,94	3,366	0,820
PT, g/dL	3,96 ^b	4,76 ^a	4,88 ^a	4,97 ^a	4,77 ^a	0,186	0,004
URE, mg/dL	10,98	8,91	9,47	10,60	9,89	0,384	0,241
Inicial II (23,83 kg)							
ALBM, g/dL	1,89	2,03	1,87	2,05	1,77	0,046	0,071
ALT, U/L	61,21	64,00	55,05	56,05	59,46	2,491	0,613
FA, U/L	374,28	361,14	381,32	389,84	365,81	9,478	0,880
GLI, mg/dL	106,79	105,63	108,96	109,26	104,57	2,699	0,803
PT, g/dL	5,26	5,24	5,36	5,08	4,93	0,114	0,431
URE, mg/dL	16,07	13,08	14,66	15,33	15,97	0,458	0,176

EPM, erro padrão da média; ALBM, albumina; ALT, alanina amino transferase; FA, fosfatase alcalina; GLI, glicose; PT, proteínas totais; URE, ureia.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

Médias, na mesma linha, com diferentes letras sobrescritas diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).

Com relação ao perfil hematológico (Tabela 6), na fase pré-inicial II, foi observada influência dos tratamentos sobre o VCM ($p=0,007$) e proteínas plasmáticas (PP) ($p=0,026$) dos leitões. Para o VCM, foram mensurados valores mais altos no tratamento OE400, diferindo do OE100 e do CN (54,19 fL vs. 50,70 fL e 51,29 fL). Com relação a PP, a maior concentração foi encontrada no grupo alimentado com a dieta contendo AMD, semelhante aos grupos OE100, OE200 e OE400.

Ao final da fase inicial II, houve diferença ($p=0,015$) entre os tratamentos para HM, em que o menor valor e o maior valor foram para OE400 e OE100, sendo $6,31 \times 10^6/\text{mm}^3$ e $6,71 \times 10^6/\text{mm}^3$, respectivamente, os quais diferiram entre si, mas foram semelhantes aos demais. Em adição, foram observados valores maiores para VCM ($p=0,013$) e menores para HCM ($p=0,011$) nos animais do tratamento OE400, novamente diferindo apenas do OE100. Os resultados de bastonetes tiveram influência dos tratamentos ($p=0,004$), com o AMD apresentando o maior percentual (0,24 %), semelhante ao OE200 e ao OE400 (0,21 % e 0,22 %).

Tabela 6. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o perfil hematológico de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Pré-inicial II (14,15 kg)							
HM, 10 ⁶ /mm ³	5,97	5,96	6,04	6,25	5,92	0,060	0,419
HG, g/dL	10,03	10,05	9,91	10,51	10,37	0,117	0,314
HT, %	30,59	31,44	30,56	32,41	32,00	0,283	0,105
VCM, fL	51,29 ^b	53,01 ^{ab}	50,70 ^b	51,97 ^{ab}	54,19 ^a	0,345	0,007
HCM, pg	19,58	18,98	19,58	20,26	19,18	0,234	0,393
CHCM, g/dL	32,78	31,93	32,42	32,42	32,39	0,210	0,776
PP, g/dL	5,05 ^b	5,43 ^a	5,30 ^{ab}	5,18 ^{ab}	5,23 ^{ab}	0,038	0,026
Plaquetas, 10 ³ /mm ³	716,18	644,25	643,06	695,53	662,67	17,909	0,652
Leucócitos, mm ³	16.158	16.575	15.918	16.464	17.333	-	0,824
Bastonetes, %	0,00	1,63	0,00	0,00	0,00	-	0,160
Segmentados, %	43,59	33,50	41,88	44,47	42,72	1,384	0,097
Eosinófilos, %	1,47	1,38	1,31	1,00	1,22	-	0,831
Basófilos, %	0,18	4,44	0,13	0,12	0,00	-	0,303
Linfócitos, %	51,76	56,56	53,81	52,00	53,94	1,415	0,843
Monócitos, %	3,00	2,50	2,88	2,41	2,11	-	0,658
Inicial II (23,83 kg)							
HM, 10 ⁶ /mm ³	6,36 ^{ab}	6,52 ^{ab}	6,71 ^a	6,59 ^{ab}	6,31 ^b	0,044	0,015
HG, g/dL	11,10	11,45	11,39	11,58	11,18	0,075	0,284
HT, %	34,50	34,94	35,00	35,71	34,67	0,208	0,521
VCM, fL	54,24 ^{ab}	53,60 ^{ab}	52,27 ^b	54,30 ^{ab}	55,09 ^a	0,307	0,013
HCM, pg	20,47 ^{ab}	21,38 ^{ab}	21,84 ^a	21,36 ^{ab}	20,36 ^b	0,165	0,011
CHCM, g/dL	32,19	32,78	32,55	32,43	32,26	0,110	0,425
PP, g/dL	5,31	5,48	5,49	5,44	5,36	0,043	0,345
Plaquetas, 10 ³ /mm ³	570,50	519,65	565,41	546,36	527,67	12,007	0,574
Leucócitos, mm ³	15.000	14.864	14.170	13.621	14.022	-	0,528
Bastonetes, %	0,00 ^c	0,24 ^a	0,06 ^{cb}	0,21 ^{ab}	0,22 ^{ab}	-	0,004
Segmentados, %	39,19	35,88	36,76	39,79	36,72	0,947	0,594
Eosinófilos, %	1,25	1,41	1,41	1,79	0,78	-	0,149
Basófilos, %	3,56	0,00	0,00	0,07	0,00	-	0,350
Linfócitos, %	52,25	58,76	57,41	52,43	59,39	1,174	0,142
Monócitos, %	3,75	3,71	4,35	3,64	2,89	-	0,378

EPM, erro padrão da média; HM, hemácias; HG, hemoglobinas; HT, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; PP, proteínas plasmáticas.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

Médias, na mesma linha, com diferentes letras sobrescritas diferiram estatisticamente (p<0,05).

3.3.3. Microbiologia intestinal

Não houve influência ($p>0,05$) no número de unidades formadoras de colônia de *E. coli*, ETB, CSR e BAL nos diferentes segmentos intestinais dos leitões recebendo diferentes tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre médias da contagem do número de unidades formadoras de colônias (log 10/g) de Enterobactérias, *Clostridium* sulfito redutores, Bactérias ácido lácticas e *Escherichia coli* no intestino de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Jejuno							
ETB	6,83	6,91	6,39	6,74	5,59	0,280	0,678
CSR	7,01	6,23	6,18	6,65	6,23	0,166	0,587
BAL	7,81	7,86	8,08	7,28	7,67	0,167	0,532
Íleo							
ETB	6,97	7,62	7,42	6,65	5,51	0,265	0,160
CSR	7,21	6,88	6,80	7,10	6,37	0,207	0,706
BAL	8,26	8,10	8,32	8,03	7,58	0,149	0,586
Cólon							
ETB	6,25	7,25	5,45	6,69	6,03	0,261	0,472
CSR	7,08	6,99	7,04	6,99	7,04	0,184	0,987
BAL	8,41	8,32	8,41	8,47	8,35	0,121	0,961
Ceco							
<i>E. coli</i>	6,95	7,65	7,33	7,51	6,58	0,219	0,597

EPM, erro padrão da média; ETB, enterobactérias; CSR, *Clostridium* sulfito redutores; BAL, bactérias ácido lácticas; *E. coli*, *Escherichia coli*.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

3.3.4. Morfometria e morfologia intestinal

Os dados referentes a morfologia e morfometria intestinal (Tabelas 8 e 9), não indicaram efeito ($p\leq 0,05$) dos tratamentos sobre as variáveis analisadas.

Tabela 8. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre a morfologia intestinal de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400	
Jejuno						
Infiltrado	1,17	1,33	1,17	1,17	1,33	0,762
Congestão	1,17	1,33	1,17	1,17	1,50	0,518
Descamação	0,67	1,17	1,00	0,67	1,00	0,269
Coccidiose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Grumos bact.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Bastonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Cistos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Muco	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Necrose	0,33	0,33	0,33	0,00	0,33	0,956
Edema	0,17	0,17	0,33	0,00	0,17	1,000
Íleo						
Infiltrado	0,67	1,33	1,33	1,00	1,00	0,115
Congestão	1,00	1,50	1,83	1,17	1,50	0,103
Descamação	0,33	1,33	1,00	1,00	1,00	0,272
Coccidiose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Grumos bact.	0,00	0,00	0,17	0,17	0,33	1,000
Bastonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Cistos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Muco	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Necrose	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,307
Edema	0,00	0,17	0,17	0,17	0,50	0,143
Cólon						
Infiltrado	1,17	1,50	1,17	1,17	1,33	0,496
Congestão	1,33	1,00	1,17	1,17	1,33	0,398
Descamação	0,00	0,33	0,67	0,67	0,67	0,406
Coccidiose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Grumos bact.	0,67	0,67	0,67	0,33	0,50	0,134
Bastonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Cistos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Muco	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Necrose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Edema	0,00	0,17	0,33	0,33	0,33	0,435

Grumos bact., grumos bacterianos.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

Tabela 9. - Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre a morfometria intestinal de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Jejuno							
AV (mm)	0,34	0,32	0,38	0,32	0,36	0,011	0,329
PC (mm)	0,19	0,25	0,22	0,17	0,18	0,009	0,136
AV:PC	1,91	1,53	1,85	1,93	2,16	0,094	0,283
Íleo							
AV (mm)	0,36	0,32	0,29	0,34	0,36	0,014	0,304
PC (mm)	0,18	0,19	0,17	0,20	0,19	0,008	0,529
AV:PC	2,08	2,04	1,77	1,82	2,17	0,139	0,649
Cólon							
PC (mm)	0,36	0,41	0,37	0,33	0,33	0,024	0,537

EPM, erro padrão da média; AV, altura de vilosidades; PC, profundidade de criptas.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

3.3.5. Peso relativo, comprimento e pH do conteúdo de órgãos

As avaliações do pH do conteúdo de órgãos digestórios, comprimento dos intestinos delgado e grosso, peso relativo de órgãos digestórios vazios e peso relativo de órgãos não digestórios (Tabela 10 e 11) não demonstraram influência ($p > 0,05$) dos tratamentos sobre as variáveis.

Tabela 10. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o pH do conteúdo de órgãos digestórios de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Estômago	3,10	4,34	3,58	3,63	4,07	0,204	0,181
Jejuno	5,90	5,20	5,13	6,08	5,77	0,204	0,355
Íleo	6,19	5,27	5,18	5,98	5,58	0,192	0,354
Ceco	5,31	5,00	5,07	5,51	5,38	0,094	0,358
Cólon	5,37	5,68	5,82	5,69	5,81	0,075	0,087

EPM, erro padrão da média.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

Tabela 11. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o comprimento e o peso relativo de órgãos de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
Comprimento (metros)							
Intestino D. ²⁾	13,01	12,59	12,71	12,73	12,73	0,200	0,975
Intestino G. ³⁾	3,15	3,15	3,02	2,85	2,94	0,076	0,657
Peso relativo (%)							
Estômago	0,77	0,73	0,80	0,79	0,76	0,010	0,249
Intestino D.	4,56	4,18	4,13	4,10	4,37	0,101	0,425
Ceco	0,24	0,27	0,24	0,26	0,26	0,007	0,611
Intestino G. ³⁾	1,87	1,89	1,98	1,80	1,77	0,052	0,709
Coração	0,48	0,52	0,55	0,53	0,54	0,011	0,145
Fígado	2,86	2,81	2,82	2,65	2,85	0,057	0,714
Rins	0,53	0,50	0,53	0,53	0,56	0,011	0,440
Baço	0,23	0,23	0,25	0,24	0,23	0,006	0,903

EPM, erro padrão da média; Intestino D., intestino delgado; Intestino G., intestino grosso.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

²⁾ Intestino D. = duodeno + jejuno + íleo.

³⁾ Intestino G. = cólon + reto.

3.3.6. Status antioxidante hepático

Os resultados da avaliação dos parâmetros do sistema antioxidante hepático (Tabela 12) demonstraram que houve diferença ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos estudados para os resultados de SOD. O grupo alimentado com CN apresentou menor atividade dessa enzima, diferindo dos demais ($p=0,047$).

Tabela 12. Efeito de óleos essenciais e antimicrobiano melhorador de desempenho sobre o *status* antioxidante hepático de leitões em fase de creche

Variáveis	Tratamentos Experimentais ¹⁾					EPM	p-valor
	CN	AMD	OE100	OE200	OE400		
GSH ²⁾	747,70	673,21	732,15	718,55	719,85	12,984	0,450
GST ³⁾	17,55	17,38	19,24	16,68	17,83	0,811	0,862
SOD ⁴⁾	469,86 ^c	615,20 ^a	550,27 ^{ab}	575,19 ^{ab}	486,70 ^b	18,940	0,047
CAT ⁵⁾	512,35	661,53	509,53	611,45	651,24	52,653	0,735
PH ⁶⁾	4.340	3.658	3.883	3.798	4.397	0,180	0,663

EPM, erro padrão da média; GSH, glutationa; GST, glutationa S-transferase; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; PH, proteína hepática.

¹⁾ CN, dieta controle; AMD, CN + 125 mg/kg antimicrobiano melhorador de desempenho enramicina 8%; OE100, CN + 100 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE200, CN + 200 mg/kg do *blend* de óleos essenciais; OE400, CN + 400 mg/kg do *blend* de óleos essenciais;

²⁾ µg/g de tecido hepático

³⁾ mmol/min/mg de proteína hepática

⁴⁾ U/mg de proteína hepática

⁵⁾mmol/min/mg de proteína hepática

⁶⁾ mg/ml

Médias, na mesma linha, com diferentes letras sobrescritas diferiram estatisticamente pelo teste de SNK ($p < 0,05$).

3.4. DISCUSSÃO

No presente estudo, os diferentes tratamentos empregados, de maneira geral, não influenciaram o desempenho zootécnico dos animais. Kommera *et al.* (2006) sugeriram que condições ambientais mais controladas, como as das instalações das unidades experimentais, em que há menor incidência de agentes estressores e controle sanitário rigoroso, podem interferir na resposta dos animais frente ao uso de aditivos alimentares melhoradores de desempenho.

A composição das dietas utilizadas, também, pode ter contribuído para os resultados obtidos. Em estudo realizado por FANG *et al.* (2019), leitões desmamados alimentados com dietas contendo níveis mais altos de energia metabolizável (EM), aproximadamente 3.300 kcal/kg, e níveis de proteína bruta (PB) entre 19,7 % e 16,9 %, os quais estão próximos aos utilizados neste trabalho, obtiveram melhor desempenho zootécnico que animais alimentados com teores reduzidos de EM e aumentados de PB. Assim, é possível que o rico aporte nutricional fornecido pelas dietas basais utilizadas no atual estudo, associado à ausência de desafios, tenha colaborado para a não ocorrência de efeitos dos aditivos empregados sobre o desempenho dos leitões.

O manejo de desmame, caracterizado por alterações ambientais, sociais e dietéticas, promovem alterações fisiológicas no TGI dos leitões que favorecem a OD (CAMPBELL *et al.*, 2013). Neste trabalho, a adição de OE às dietas dos leitões, na dose mais alta, exerceu influência positiva sobre a OD, ocasionando a sua redução. Igualmente, Zeng *et al.* (2015), observaram redução na OD de leitões ($7,26 \pm 1,57$ kg) alimentados com dieta reduzida em energia e adicionada de 250 mg/kg de um aditivo composto por timol e cinamaldeído.

A diarreia pode ser definida como a excreção de fezes líquidas, acompanhadas de água e eletrólitos oriundos do TGI, que são expelidas por meio da contração anormal dos músculos intestinais, associada ou não a infecções por microrganismos (LI *et al.*, 2013). Esse efeito antidiarreico observado pode estar relacionado ao fato de determinados compostos presentes nos fitogênicos, como o cinamaldeído, serem capazes de diminuir a motilidade gastrointestinal por meio da competição com o neurotransmissor acetilcolina por receptores muscarínicos do sistema nervoso parassimpático, reduzindo o estímulo para contração muscular. Além disso, podem interagir com canais de Cl^- presentes na membrana apical dos enterócitos, reduzindo a perda extracelular desse íon, e com o transportador de Na^+ e glicose (SGLT1), intensificando o transporte dessas moléculas para o interior da célula, resultando no

aumento da absorção de água via paracelular, com menor perda nas fezes (LI *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2016; DOS SANTOS NEGREIROS *et al.*, 2019).

Na presente pesquisa, ainda, foi especulado que a OD pode estar relacionada aos resultados sanguíneos obtidos, visto que o tratamento em que houve valores maiores de HM e HCM, e menores de VCM, o OE100, foi o que, de maneira geral, apresentou maior OD. As variáveis HM, VCM e HCM, representam a quantidade de hemácias presentes na amostra sanguínea, seu volume na amostra, e a quantidade de hemoglobina contida em cada uma delas, respectivamente. Em casos de desidratação, pode haver maior concentração de hemácias na amostra, visto a redução da parte aquosa do sangue. Consequentemente, é possível que haja aumento na quantidade de hemoglobina na amostra, nesse caso refletida no HCM, e diminuição do VCM, pois hemácias com menos água intracelular apresentam menor volume (BARGER, 2003; GALLAGHER, 2017).

As análises sanguíneas ainda demonstraram efeito dos tratamentos sobre as variáveis PT e PP na fase pré-inicial II. A análise de proteínas totais difere da análise de proteínas plasmáticas pela ausência do fibrinogênio na amostra, no entanto, ambas contabilizam a quantidade de albuminas e globulinas presentes no sangue. Valores aumentados, em que não há aumento de albuminas, podem estar relacionados ao aumento na quantidade de globulinas (MAYER; DONNELLY, 2013). LI *et al.* (2012) relataram que OE podem favorecer o aumento de imunoglobulina G no sangue dos suínos, o que pode ser uma possível justificativa para a elevação do nível de proteínas totais nos animais que receberam OE, no presente trabalho. Quanto às PP, é possível que além das globulinas, o teor de fibrinogênio, também, possa estar associado aos resultados obtidos.

Na fase inicial II, houve efeito dos tratamentos sobre os bastonetes sanguíneos, os quais são neutrófilos jovens que ainda não atingiram maturação completa e fazem parte do sistema imune inato, participando das respostas inflamatórias frente a infecções ou injúrias teciduais. São liberados na corrente sanguínea quando a medula óssea é estimulada por substâncias pró-inflamatórias (CAVALLAZZI *et al.*, 2010; SCHEPETKIN *et al.*, 2016). Schepetkin *et al.* (2016) relatam que OE possuem capacidade de modular a migração de neutrófilos, melhorando a resposta imune, o que pode estar relacionado ao aumento dessas células nos grupos tratados com OE no presente trabalho.

Diferentes autores mencionam que os OE podem beneficiar a estrutura do epitélio intestinal (CHENG *et al.*, 2018; TIAN; PIAO, 2019) e, também, modular a sua microbiota, exercendo efeito antimicrobiano sobre espécies patogênicas e, assim, favorecendo espécies benéficas (ZHAI *et al.*, 2018). No estudo realizado por Wei *et al.* (2017), foi obtida menor

contagem de *E. coli* no jejuno de leitões tratados com uma combinação de 50 mg/kg timol e 50 mg/kg carvacrol, além de aumento na população de *Lactobacillus*. Zeng *et al.* (2015) incluíram 250 mg/kg de timol e cinamaldeído na dieta, com redução de energia, de leitões desmamados aos 28 dias de idade, e obtiveram aumento na AV e AV:PC no jejuno dos animais. No entanto, no atual estudo, não foram observados efeitos dos tratamentos para os dados de morfometria, morfologia e microbiologia intestinal.

Uma possível justificativa para essa ausência de efeitos dos OE sobre os parâmetros intestinais avaliados é que os compostos do *blend* utilizado não eram micro encapsulados. Segundo Michiels *et al.* (2008), compostos como o carvacrol e o timol, na forma não encapsulada, são absorvidos em sua maioria no estômago, com menor quantidade atingindo o intestino, e conseqüentemente, menor ação nesse órgão. Isso, associado ao fato de serem rapidamente absorvidos pelo epitélio do TGI, confere menor tempo de permanência no lúmen para ação sobre a microbiota ali presente.

Para as avaliações referentes ao comprimento, peso relativo e pH do conteúdo de órgãos, não houve diferenças entre os tratamentos, o que está de acordo com os achados de Gois *et al.* (2016) e de Cairo *et al.* (2018) ao avaliarem a adição de diferentes doses (500, 1000, 1500 mg/kg) de OE de *Schinus terebinthifolius* Raddi à dieta de leitões (5,65 ± 0,78 kg) desmamados aos 21 dias de idade, e seus efeitos sobre o pH dos conteúdos do estômago, jejuno e ceco, e do peso relativo de órgãos digestórios e não digestórios. Esses resultados sugerem que os OE podem ser utilizados na alimentação de leitões sem efeitos negativos sobre os órgãos dos animais.

Fatores estressores diversos, como o período de desmame ou infecções por patógenos, podem aumentar a produção de espécies de oxigênio reativas (EOR) nos tecidos vitais dos leitões, tornando as células mais suscetíveis a injúrias. Essas EOR são metabólitos altamente reativos, resultantes do metabolismo energético celular normal que ocorre na mitocôndria, em que o oxigênio (O₂) participa como acceptor de elétrons nas reações enzimáticas (ZHU *et al.*, 2012).

Com a finalidade de se proteger dos danos oxidativos causados pelos EOR, as células são equipadas com um sistema antioxidante, formado por compostos enzimáticos como a SOD, CAT e GST, e não enzimáticos, como o tripeptídeo GSH, que neutralizam EOR, limitando sua toxicidade. O estresse oxidativo ocorre quando a presença de EOR supera a capacidade de ação dos agentes antioxidantes (ZOU *et al.*, 2016). Por esse motivo, as atividades dessas enzimas nos tecidos animais têm sido utilizadas como indicadores que auxiliam no monitoramento do estresse oxidativo (DEGROOTE *et al.*, 2020).

No presente trabalho, a avaliação do *status* antioxidante demonstrou que houve efeito dos tratamentos utilizados sobre a atividade de SOD no fígado dos animais. Segundo Asakura e Kitahora (2018), durante as reações metabólicas celulares, a primeira EOR produzida é o ânion superóxido (O_2^-). A SOD converte esse ânion em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é, posteriormente, decomposto à água (H_2O) pelas ações das enzimas CAT e glutathione peroxidase. O tripeptídeo GSH, também, participa dessas reações, pois atua como receptor de oxigênio proveniente do H_2O_2 durante a sua neutralização.

O aumento da atividade de SOD observado com a inclusão de OE neste trabalho foi considerado benéfico, visto que não houve redução dos níveis de GSH, indicando que os OE foram capazes de estimular o sistema de defesa antioxidante sem aumentar a presença de EOR. Caso contrário, haveria menor concentração de GSH, devido a sua participação em reações de neutralização de H_2O_2 .

Os autores ZOU *et al.* (2016), verificaram que o possível mecanismo pelo qual alguns OE são capazes de aumentar a atividade de SOD é pela ativação do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), uma proteína intracelular responsável pela regulação de genes relacionados a expressão de enzimas antioxidantes. No experimento conduzido por Tian e Piao (2019), os autores observaram aumento nas atividades de SOD e CAT sérica de leitões ($8,1 \text{ kg} \pm 1,4 \text{ kg}$) tratados com 100 mg/kg de uma combinação de timol e cinamaldeído. Ainda, foi relatado aumento na atividade de SOD no fígado e jejuno dos animais, com resultados análogos ao tratamento contendo AMD.

As diferentes pesquisas relacionadas ao uso de OE apresentam dados variados sobre os efeitos desses compostos nos animais. Neste trabalho, alguns parâmetros avaliados, como a OD, perfis hematológicos e bioquímicos sanguíneos, e o *status* antioxidante hepático, foram influenciados pela inclusão de OE, e outros, como o desempenho zootécnico, morfometria, morfologia e microbiologia intestinais, não foram. Os autores Ahsan *et al.* (2018) sugeriram que diferentes doses de OE podem ser necessárias para que haja efeito sobre diferentes parâmetros, demonstrando o quão importante é o estudo sobre esses compostos, a fim de entender como melhor utilizá-los.

3.5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho sugerem que óleos essenciais podem ser utilizados em dietas para leitões em fase de creche como uma estratégia alternativa ao uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho convencionais. A adição de OE às dietas foi capaz de influenciar positivamente a ocorrência de diarreia, perfis hematológicos e bioquímicos sanguíneos, e o *status* antioxidante hepático dos animais, sem prejuízos à saúde do trato gastrointestinal.

3.6. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v.105, p.121–126, 1984.
- AHSAN, U.; KUTER, E.; RAZA, I. et al. Dietary supplementation of different levels of phytogetic feed additive in broiler diets: the dynamics of growth performance, caecal microbiota, and intestinal morphometry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.20, p.737-746, 2018.
- ASAKURA, H.; KITAHORA, T. Antioxidants and polyphenols in inflammatory bowel disease: ulcerative colitis and Crohn disease. In: Polyphenols: prevention and treatment of human disease. Academic Press, 2018. p. 279-292.
- BARGER, A. M. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.33, n.6, p.1207-1222, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- CAIRO, P. L. G.; GOIS, F. D.; SBARDELLA, M. et al. Effects of dietary supplementation of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, n.2, p.541-548, 2018.
- CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, n.1, p.1-4, 2013.
- CARDINAL, K. M.; ANDRETTA, I.; SILVA, M. K. D. et al. Estimation of productive losses caused by withdrawal of antibiotic growth promoter from pig diets–Meta-analysis. **Scientia Agricola**, v.78, 2021.
- CAVALLAZZI, R.; BENNIN, C. L.; HIRANI, A. et al. Review of A Large Clinical Series: Is the Band Count Useful in the Diagnosis of Infection? An Accuracy Study in Critically Ill Patients. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.25, n.6, p.353-357, 2010.
- CHENG, C.; XIA, M.; ZHANG, X. et al. Supplementing oregano essential oil in a reduced-protein diet improves growth performance and nutrient digestibility by modulating intestinal bacteria, intestinal morphology, and antioxidative capacity of growing-finishing pigs. **Animals**, v.8, n.9, p.159, 2018.
- COLSON, V.; MARTIN, E.; ORGEUR, P. et al. Influence of housing and social changes on growth, behaviour and cortisol in piglets at weaning. **Physiology & behavior**, v. 107, n.1, p.59–64, 2012.
- DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; DE ARRUDA SILVEIRA, N. F. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017.
- DEGROOTE, J.; VERGAUWEN, H.; WANG, W. et al. Changes of the glutathione redox system during the weaning transition in piglets, in relation to small intestinal morphology and barrier function. **Journal of animal science and biotechnology**, v.11, p.1-17, 2020.
- DOS SANTOS NEGREIROS, P.; DA COSTA, D. S.; DA SILVA, V. G. et al. Antidiarrheal activity of α -terpineol in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.110, p.631-640, 2019.
- FANG, L. H.; JIN, Y. H.; DO, S. H. et al. Effects of dietary energy and crude protein levels on growth performance, blood profiles, and nutrient digestibility in weaning pigs. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v.32, n.4, p.556, 2019.
- GALLAGHER, P. G. Disorders of erythrocyte hydration. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v.130, n.25, p.2699-2708, 2017.
- GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry Bioenergetics**, v.45, p.41–45, 1998.

- GOIS, F. D.; CAIRO, P. L. G.; DE SOUZA CANTARELLI, V. et al. Effect of Brazilian red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, diarrhea and gut health of weanling pigs. **Livestock Science**, v.183, p.24-27, 2016.
- GRESSE, R.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FLEURY, M. A. et al. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. **Trends in Microbiology**, v.25, n.10, p.851-873, 2017.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v.249, n.22, p.7130-7139, 1974.
- HEO, J. M.; OPAPEJU, F. O.; PLUSKE, J. R. 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.
- HUANG, C.; QIAO, S.; LI, D. et al. Effects of Lactobacilli on the Performance, Diarrhea Incidence, VFA Concentration and Gastrointestinal Microbial Flora of Weaning Pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.17, n.3, p.401-409, 2004.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO (16649-2:2001). Microbiology of food animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. 1ed. The International Organization for Standardization, 2001. 8p.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A. et al. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and experimental medicine**, v.2, n.3, p.131-135, 2002.
- KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MÄRZ, R. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, v.66, n.6, p.495-505, 2000.
- KOMMERA, S. K., MATEO, R. D., NEHER, F. J. et al. Phytobiotics and organic acids as potential alternatives to the use of antibiotics in nursery pig diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.19, n.12, p.1784-1789, 2006.
- KRAIESKI, A. L.; HAYASHI, R. M.; SANCHES, A. et al. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry science**, v.96, n.5, p.1078-1087, 2017.
- LEKAGUL, A.; TANGCHAROENSATHIEN, V.; YEUNG, S. Patterns of antibiotic use in global pig production: a systematic review. **Veterinary and Animal Science**, v.7, p.100058, 2019.
- LI, J.; WU, X. L.; CHEN, Y. et al. Antidiarrheal properties of different extracts of Chinese herbal medicine formula Bao-Xie-Ning. **Journal of integrative medicine**, v.11, n.2, p.125-134, 2013.
- LI, P.; PIAO, X.; RU, Y. et al. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 11, p. 1617, 2012.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; LÓPEZ-ALONSO, M.; PECHOVA, A. et al. Alternatives to antibiotics and trace elements (copper and zinc) to improve gut health and zootechnical parameters in piglets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, p.114727, 2020.
- MA, F.; XU, S.; TANG, Z. et al. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, v.3, n.1, p.32-38, 2020.

- MAYER, J.; DONNELLY, T. M. **Clinical veterinary advisor**. 1ed. Elsevier/Saunders, 2013.784p.
- MICHIELS, J., MISSOTTEN, J., DIERICK, N. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.13, p.2371-2381, 2008.
- NGOH, M.; WRZESINSKI, C.; YANG, Y. et al. Evaluation of the Presence and Level of Enramycin in Broiler Tissues Following In-Feed Administration at Therapeutic Dose. **Journal of Applied Poultry Research**, v.27, n.4, p.449-452, 2018.
- OMONIJO, F. A.; NI, L.; GONG J. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.126-136, 2018.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. et al. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1994. 279p.
- RODRIGUES, F. A. P.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; PRATA, M. M. G. et al. Fisiologia da barreira epitelial intestinal. In: **Sistema digestório: Integração básico-clínica**. ePuB. São Paulo: Blucher, 2016. p.441-478.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**, 4.ed. Viçosa: UFV, 2017. 488p.
- SCHEPETKIN, I. A.; KUSHNARENKO, S. V.; ÖZEK, G. et al. Modulation of human neutrophil responses by the essential oils from *Ferula akitschkensis* and their constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.64, n.38, p.7156-7170, 2016.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.
- TIAN, Q.; PIAO, X. Essential oil blend could decrease diarrhea prevalence by improving antioxidative capability for weaned pigs. **Animals**, v.9, n.10, p.847, 2019.
- WEI, H. K., WANG, J., CHENG, C. et al. Application of plant essential oils in pig diets. In: **feed additives**. Academic Press, 2020. p.227-237.
- WEI, H. K.; XUE, H. X.; ZHOU, Z. X. et al. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v.11, n.2, p.193-201, 2017.
- WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v.86, n.suppl_14, p.E140-E148, 2008.
- ZENG, Z.; XU, X.; ZHANG, Q. et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v.86, n.3, p.279-285, 2015.
- ZHAI, H.; LIU, H.; WANG, S. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.179-186, 2018.
- ZHU, L. H.; ZHAO, K. L.; CHEN, X. L. et al. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. **Journal of Animal Science**, v.90, n.8, p.2581-2589, 2012.
- ZOU, Y.; WANG, J.; PENG, J. et al. Oregano essential oil induces SOD1 and GSH expression through Nrf2 activation and alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IPEC-J2 cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, 2016.