

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS

Avaliação de estratégias nutricionais na fase de creche, com foco no uso de promotores de crescimento e na complexidade das dietas.

Evaluation of nutritional strategies in the nursery phase, focusing on the use of growth promoters and on the complexity of diets.

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Roberto M. C. Guedes

Área de concentração: Patologia Animal

Belo Horizonte/ MG
Escola de Veterinária – UFMG
2019

R433a Rezende, Lucas Avelino, 1993-
Avaliação de estratégias nutricionais na fase de creche, com foco no uso de promotores de crescimento e na complexidade das dietas = Evaluation of nutritional strategies in the nursery phase, focusing on the use of growth promoters and on the complexity of diets / Lucas Avelino Rezende. – 2019.
63 p. : il.

Orientador: Roberto M. C. Guedes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias.
Inclui bibliografia

1. Leitão (Suíno) – Alimentação e rações – Teses. 2. Leitão (Suíno) – Crescimento – Teses. 3. Dieta em veterinária – Teses. 4. Óleos essenciais – Teses. 5. Microbioma – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. III. Título.

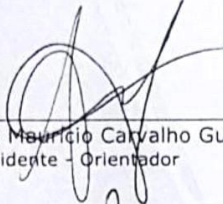
CDD – 636.408 5

FOLHA DE APROVAÇÃO

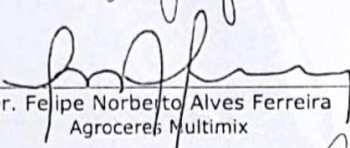
LUCAS AVELINO REZENDE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

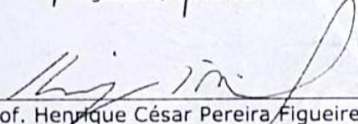
Aprovada em 29 de Março de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
Presidente - Orientador



Dr. Felipe Norberto Alves Ferreira
Agrocereais Multimax



Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
Escola de Veterinária - UFMG

“Hoje me sinto mais forte

Mais feliz, quem sabe

Só levo a certeza

De que muito pouco sei

Ou nada sei”

Tocando em Frente, Almir Sater

AGRADECIMENTOS

O caminho que eu trilhei até aqui não foi fácil. Tenho certeza que não conseguiria chegar onde cheguei sem o apoio de diversas pessoas ao meu redor, que me ajudaram direta ou indiretamente a concluir essa etapa na minha vida.

Primeiro agradeço a meus pais, que sempre me motivaram a buscar sempre a excelência e que sempre me apoiaram para alcançar meus objetivos.

Ao professor Roberto, que viu potencial em mim, que acreditou nos meus projetos e que me ensinou muito mais do que Patologia...

Aos meus amigos da pós, em especial o melhor grupo de Diagnóstico Post Mortem que poderia existir (Mirtha, Aysa e Thaynara), que sempre me ajudaram muito a passar nas matérias, e que ajudaram a sobreviver aos longos dias de estudo e de provas. Também os residentes da Patologia, por sempre estarem dispostos a trocar experiências e ensinar um pouco mais sobre Patologia.

Aos amigos de Laboratório “Família OINC”, por todos os anos de convivência e de companheirismo.

Aos técnicos do setor, Leimar, Luis, Natália, sempre dando suporte para que as coisas acontecessem da melhor maneira.

A empresa Agrocerec Multimix, por acreditar no meu potencial e conceder a estrutura para a realização dos experimentos. Também ao pessoal da Centro de Pesquisas Professor José Maria Lamas da Silva, que foram fundamentais para o sucesso do experimento.

Por fim, todas outras pessoas que indiretamente estiveram comigo ao longo desses dois anos, sempre me apoiando e motivando a dar meu melhor em tudo o que eu fizesse.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE ABEVIATURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS | 11 |
| LISTA DE FIGURAS | 12 |
| RESUMO | 13 |
| ABSTRATC | 13 |
| 1. Introdução | 14 |
| 2. Objetivos | 14 |
| 3. Revisão de literatura | 14 |
| 3.1. Colonização do Intestino de Leitões | 14 |
| 3.2. Relação entre microbiota e desenvolvimento intestinal e do animal | 15 |
| 3.3. Fisiologia digestiva do leitão pós-desmame | 16 |
| 3.4. Estratégias nutricionais no pós-desmame para a manutenção da saúde intestinal 18 | |
| 3.4.1. Energia | 18 |
| 3.4.2. Proteínas | 19 |
| 3.4.3. Aditivos | 20 |
| 3.4.3.1. Enzimas exógenas | 20 |
| 3.4.3.2. Antimicrobianos | 21 |
| 3.4.3.3. Alternativas ao uso de antimicrobianos | 21 |
| 3.5. Microbioma | 23 |
| 4. Materiais e métodos | 24 |
| 4.1. Desempenho dos animais | 24 |
| 4.2. Experimento 1 | 24 |
| 4.2.1. Animais e Locação | 24 |
| 4.2.2. Delineamento experimental | 24 |
| 4.2.3. Morfometria Intestinal | 26 |
| 4.2.4. Análise estatística | 26 |
| 4.3. Experimento 2 | 27 |
| 4.3.1. Animais e Locação | 27 |
| 4.3.2. Delineamento experimental | 27 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.3. | Microbioma..... | 30 |
| 4.3.3.1. | Amostras | 30 |
| 4.3.3.2. | Sequenciamento 16s | 30 |
| 4.3.3.3. | Análises de bioinformática | 31 |
| 4.3.4. | Análise estatística | 31 |
| 5. | Resultados | 32 |
| 5.1. | Experimento 1..... | 32 |
| 5.1.1. | Peso e ganho de peso diário | 32 |
| 5.1.2. | Consumo diário de ração | 33 |
| 5.1.3. | Conversão alimentar | 33 |
| 5.1.4. | Morfometria Intestinal | 34 |
| 5.2. | Experimento 2..... | 35 |
| 5.2.1. | Peso e ganho de peso diário | 35 |
| 5.2.2. | Consumo diário de ração | 35 |
| 5.2.3. | Conversão alimentar | 36 |
| 5.2.4. | Microbioma..... | 36 |
| 6. | Discussão | 43 |
| 7. | Conclusão | 44 |
| 8. | Referências | 45 |
| 9. | ANEXO 1. Níveis nutricionais Experimento 1 | 54 |
| 10. | ANEXO 2. Níveis nutricionais Experimento 2 | 55 |
| 11. | ANEXO 3. Detalhamento de primers, adaptadores e código de barras desenvolvidos para método fusion de sequenciamento. | 57 |
| 12. | ANEXO 4. Principais gêneros comparados entre tratamentos em cada idade | 60 |

LISTA DE ABEVIATURAS

TGI - Trato Gastrointestinal

GALT - Tecidos Linfóides Associados ao Intestino

Th1- T helper 1

Th17 - T helper

Treg - células T reguladoras

Zn - Zinco

PCR – Reação em cadeia de polimerase

DNA - ácido desoxirribonucleico

OTU - unidade taxonômica operacional

QIIME - Percepções Quantitativas na Ecologia Microbiana

EPM - Erro Padrão da Média

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Consumo de ração e divisão das fases de creche

Tabela 2. Descrição das fórmulas das dietas Experimento 1

Tabela 3. Esquema de fases para cada tratamento

Tabela 4. Consumo de ração tratamento BC

Tabela 5. Consumo de ração tratamento AC

Tabela 6. Descrição das fórmulas das dietas Experimento 2

Tabela 7. Peso (kg) médio dos animais ao final de cada fase de tratamento

Tabela 8. Ganho de peso (kg) acumulado de 21 dias até o final da fase

Tabela 9. Consumo de Ração diário acumulado por animal (kg)

Tabela 10. Conversão alimentar acumulada dos tratamentos CH e SH

Tabela 11. Altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação entre altura de vilosidade e profundidade de cripta (AV:PC) aos 42 e 70 dias de vida

Tabela 12. Peso (kg) médio dos animais

Tabela 13. Ganho de peso (kg) acumulado a partir dos 21 dias

Tabela 14. Consumo de ração diário por animal (kg)

Tabela 15. Conversão alimentar acumulada dos tratamentos BC e AC

Tabela 16. Riqueza e diversidade da comunidade microbiana fecal de leitões em fase de creche.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Índice Shanon (Diversidade) – Comparação da diversidade entre os tratamentos nos diferentes momentos de coleta 21, 42 e 70 dias de idade. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 2. Índice Chao (Riqueza) – Comparação da riqueza entre os tratamentos nos diferentes momentos de coleta 21, 42 e 70 dias de idade. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 3. Índice Shanon (Diversidade) – Comparação da diversidade entre os diferentes momentos da coleta dentro de cada tratamento. No tratamento BC, houve diferença estatística entre as duas primeiras coletas e a última coleta que foi a coleta que apresentou a maior diversidade. Já no tratamento AC a segunda coleta foi igual a primeira e a terceira coletas, porém a primeira e a terceira coletas foram diferentes entre si.

Figura 4. Índice Chao (Riqueza) – Comparação da riqueza entre os diferentes momentos da coleta dentro de cada tratamento. No tratamento BC, a segunda coleta foi a coleta com menor riqueza, e a primeira e terceira coletas com riquezas semelhantes. No tratamento AC todas as coletas foram diferentes estatisticamente com a maior riqueza na terceira coleta, seguida pela primeira coleta e segunda coleta.

Figura 5. Abundância de gêneros aos 42 dias de idade. Os gêneros mais prevalentes em ambos tratamentos foram *Prevotella*, *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Mitsuokella*. Houve diferença estatística somente nos gêneros *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bulleidia*, *Bacteriodes* e *Lachnospira*. Sendo que no tratamento A os gêneros *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Bacterioides* foram mais prevalentes nos animais do tratamento BC do que no tratamento AC.

Figura 6. Abundância relativa aos 70 dias de idade. Os gêneros mais prevalentes em ambos tratamentos foram *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Megasphaera*. Os gêneros que se diferiram entre os tratamentos foram *Coprococcus*, *Mitsuokella*, *Dehalobacterium*. Somente o gênero *Mitsuokella* foi mais prevalente no tratamento AC.

RESUMO

O desmame é um estágio crítico na produção de suínos, sendo uma fase que une vários fatores de estresse para leitões e com isso há uma grande incidência de problemas entéricos nos 14 dias pós desmame. O presente trabalho foi conduzido com dois experimentos. O primeiro avaliando a resposta (integridade intestinal e parâmetros zootécnicos) de leitões tratados com óleos essenciais, probióticos e ácidos orgânicos com e sem uso de Halquinol como promotor de crescimento. Onde os animais tratados com o promotor de crescimento foram mais eficientes no ganho de peso e na conversão alimentar ($P < 0.05$), porém não houve diferença na histomorfologia intestinal. O segundo experimento foi conduzido para avaliar a influência da complexidade das rações de creche sobre o desempenho e sobre a comunidade microbiana de leitões no período de creche. Não houve diferença de desempenho entre os grupos de animais. As modificações na microbiota foram percebidas entre as idades de coleta e não houve diferenças significativas entre os tratamentos. O uso de Halquinol como promotor de crescimento associado à óleos essenciais na fase de creche melhora o desempenho dos animais quando comparados a animais tratados somente com óleos essenciais. A complexidade das dietas afeta a composição da microbiota, porém não afeta o desempenho final na fase de creche.

Palavras chave: leitões, desmame, microbioma, óleos essenciais, promotores de crescimento.

ABSTRACT

Weaning is a critical stage in the production of pigs, being a phase that combine several stress factors for piglets and, consequently, there is a high incidence of enteric problems up to 14 days after weaning. The present work was conducted with two experiments, one evaluating the response (intestinal integrity and zootechnical parameters) of piglets treated with essential oils, probiotics and organic acids with and without Halquinol used as growth promoter. The first evaluating the response (intestinal integrity and zootechnical parameters) of piglets treated with essential oils, probiotics and organic acids with and without use of Halquinol as growth promoter. Where the animals treated with the growth promoter were more efficient in weight gain and feed conversion ($P < 0.05$), however there was no difference in the intestinal histomorphology. The second experiment was conducted to evaluate the influence of the complexity of the nursery rations on the performance and on the microbial community of piglets in the daycare period. There was no difference in performance between groups of animals. The changes in the microbiota were perceived between the ages of collection and there were no significant differences between the treatments. The use of Halquinol associated with essential oils in the nursery phase improves the performance of animals when compared to animals treated only with essential oils. The complexity of the diets affects the composition of the microbiota but does not affect final performance in the nursery phase.

Keywords: piglets, weaning, microbiome, essential oils, growth promoters.

1. Introdução

O desmame é um estágio crítico na produção de suínos, sendo uma fase em que estão associados vários fatores de estresse para leitões, como a separação de suas mães, formação de novos grupos com indivíduos desconhecidos, mudança de ambiente e mudança na alimentação. Sendo assim, o crescimento e desenvolvimento intestinal pós-natal pode ser comprometido (Lallès et al., 2007). Essa fase é geralmente associada à perda de peso nas primeiras semanas e maior ocorrência de doenças entéricas. A diarreia pós-desmame é tipicamente associada à eliminação fecal de grande número de sorotipos enterotoxigênicos de *E. coli* beta-hemolíticos, que proliferam particularmente no intestino delgado (Heo et al., 2013).

Para evitar perdas maiores no pós-desmame, uma das estratégias é a modulação da microbiota residente. Já foi demonstrado que bactérias comensais modulam a expressão de genes envolvidos em várias funções intestinais importantes, incluindo fortificação da barreira mucosa, metabolismo xenobiótico, angiogênese e a maturação intestinal pós-natal (Hooper et al., 2001). Para a modulação da microbiota, a forma mais comum e efetiva é a utilização de antimicrobianos em doses abaixo da dose terapêutica, sendo considerados como promotores de crescimento. No entanto, apesar da capacidade evidente de melhorar o crescimento e o desempenho, há evidências da seleção de cepas bacterianas resistentes. Com isso, em diversos países já existe proibição do uso desses produtos como promotores na nutrição animal (Cairo et al., 2018).

Diante disso, várias propostas têm sido estudadas incluindo a suplementação da dieta com substâncias que possuem propriedades antimicrobianas e / ou imunoestimulantes, tais como ácidos orgânicos, extratos naturais de plantas, produtos de origem animal, probióticos e prebióticos (Mellor, 2000; Kamel, 2000; Hernández, et al., 2004). O bom desenvolvimento funcional do trato gastrointestinal é um dos principais fatores que auxiliam no controle de potenciais patógenos durante o período neonatal e pós-desmame (Gallois et al., 2009).

Em contrapartida, a pressão para redução dos custos faz com que alternativas para a complexidade de dietas pós-desmame sejam estudadas. E com isso há a necessidade de saber o real impacto dessa baixa complexidade nas rações iniciais sobre o desenvolvimento do animal nas fases iniciais de creche (Skinner et al., 2014).

2. Objetivos

Comparar integridade intestinal (histomorfometria) e os parâmetros zootécnicos (ganho de peso diário, conversão alimentar, consumo de ração e peso final) de leitões tratados com óleos essenciais, probióticos e ácidos orgânicos com ou sem o uso de promotor de crescimento convencional. Comparar a microbiota e os parâmetros zootécnicos de suínos na fase de creche alimentados com dietas de alta e baixa complexidade.

3. Revisão de literatura

3.1. Colonização do Intestino de Leitões

O estabelecimento da microbiota intestinal é influenciado por muitos fatores, como pH intestinal, disponibilidade de substratos, secreção de muco, peristaltismo, adesão bacteriana, dieta e tempo de trânsito ao longo do trato gastrointestinal (TGI) (Hao e Lee, 2004). Além disso, envolve processos complexos de sucessão microbiana, bem como as interações da microbiota com o hospedeiro, gerando assim, populações densas e estáveis que habitam regiões específicas do intestino (Mackie et al., 1999).

Ao nascimento, os suínos são livres de bactérias no TGI. O processo inicial de colonização se dá já no momento do nascimento quando o leitão entra em contato com os microrganismos presentes no canal de parto. Após isso, a amamentação e o contato direto com o ambiente são as fontes principais de colonização do TGI (O'Sullivan et al., 2005; Heo et al., 2013).

Depois da colonização inicial, a microbiota intestinal permanece relativamente estável até o desmame. Alterações microbianas profundas e acentuadas são observadas nas duas primeiras semanas pós-desmame (Yin e Zheng, 2005; Konstantinov et al., 2006). Isso se deve principalmente a fatores estressantes que reduzem a imunidade do animal, além da mudança abrupta da dieta com a introdução de alimentos sólidos e o uso de antimicrobianos na alimentação (Konstantinov et al., 2004).

Nesse sentido, inicialmente a microbiota presente no TGI de leitões é formada basicamente por lactobacilos, enterobactérias e estreptococos. Após a introdução de alimento sólido, os anaeróbios aumentam em número e em diversidade até alcançar estabilidade (Servin 2004; Inoue et al. 2005; Konstantinov et al. 2006).

O perfil microbiano depende de fatores relacionados a dieta, mas, principalmente, está intimamente ligado a relação do hospedeiro com a microbiota residente. De acordo com Simpson et al. (2000), a composição da microbiota intestinal em leitões difere individualmente em animais que receberam a mesma dieta.

3.2. Relação entre microbiota e desenvolvimento intestinal e do animal

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na função intestinal normal e na manutenção da saúde do hospedeiro (Servin, 2004). Animais gnotobióticos, recém-nascidos e desmamados tem maior predisposição a doenças entéricas. Particularmente animais gnotobióticos têm epitélios intestinais hipoplásicos e peristaltismo diminuído, além da função imunológica diminuída e redução da massa de tecido linfóide (Hopwood e Hampson, 2003; O'Sullivan 2005). Já foi demonstrado que a reintrodução da microbiota nesses animais restaurou a função intestinal, a proliferação da mucosa, o desenvolvimento imunológico e o crescimento dos animais (Shroff et al., 1995; Umesaki e Setoyama, 2000).

A ativação de linfócitos T e B depende principalmente da apresentação de antígenos pelas células imunes inatas adaptativas que incluem células dendríticas, macrófagos e neutrófilos e esses antígenos vêm da microbiota, nutrientes, metabólitos e patógenos nocivos. As células T e B imaturas migram e se acumulam nos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) onde serão ativadas. As células T CD8 + migram para o epitélio intestinal, enquanto as células CD4 + T e B entram na lâmina própria (Mowat, 2003). Os principais tipos celulares de células T CD4 + intestinais são as células T helper 1 (Th1), T helper (Th17) e células T reguladoras (Treg). No intestino, as células Treg mantêm a homeostase, por induzirem funções imunossupressoras (Harrison e Powrie, 2013) limitando a expansão de células T efetoras específicas de antígenos, incluindo células Th1 e Th17 que induzem uma resposta inflamatória, proteção da barreira mucosa e reparo tecidual (Huber et al., 2012). Também foi demonstrado que a diferenciação de células Th17 na mucosa do intestino delgado depende de uma microbiota específica (Ivanov et al., 2008, 2009).

Além disso, bactérias comensais são fundamentais para a saúde do hospedeiro, desempenhando um papel de barreira física bloqueando o acesso de possíveis patógenos à camada epitelial, como também competindo por nutrientes ou gerando produtos de metabolismo que inibem o crescimento e a sobrevivência dos patógenos entéricos. (Littman e Pamer 2011).

A colonização bacteriana pode influenciar a morfologia e a função intestinal. Alguns estudos demonstram que há alterações nos parâmetros histomorfológicos do intestino delgado (Shirkey et al., 2006), proliferação de células epiteliais e apoptose (Willing e Van Kessel, 2007), atividade de enzimas de borda em escova (Willing e Van Kessel, 2009), bem como amplos efeitos nos perfis transcriptômicos epiteliais (Chowdhury et al., 2007; Meurens et al., 2007) e proteômicos entre animais gnotobióticos e animais inoculados com bactérias (Danielsen et al., 2007; Pasternak et al., 2016).

As bactérias intestinais afetam o ciclo dos enterócitos, aumentando a apoptose e a proliferação celular, por indução de uma resposta inflamatória e aumento da expressão de sinalizadores de apoptose. A manipulação da microbiota pode melhorar a eficiência do crescimento melhorando a função digestiva e reduzindo o custo metabólico de substituir o epitélio intestinal. A ativação exacerbada desses fatores de apoptose faz com que a energia de manutenção aumente, uma vez que aumenta o ciclo celular. Porém a ativação adequada do epitélio intestinal é importante na formação de *tight junctions* e na manutenção da renovação celular adequada (Willing e Van Kessel, 2007).

A principal fonte de energia que a microbiota intestinal utiliza são os carboidratos fermentáveis, como oligossacarídeos não digeríveis, polissacarídeos não amiláceos e diferentes tipos de amido resistente (Houdijk et al., 2002). Essas fontes energéticas são aproveitadas por meio de fermentação, que é muito importante para os suínos. Uma vez que esse processo influencia na motilidade intestinal, melhora a eficiência alimentar e contribui para produção de vitaminas (Williams et al., 2001).

A energia gerada pela fermentação microbiana pode suprir até 30% das necessidades energéticas para manutenção em um suíno em crescimento. O principal produto da fermentação são os ácidos graxos de cadeia curta, incluindo butirato, acetato e propionato (Varel e Yen 1997). Sendo o butirato uma das principais fontes de energia para os enterócitos, especialmente os que compõem o intestino grosso (Pryde et al., 2002).

A fermentação de proteínas, por sua vez, gera metabólitos que são prejudiciais como aminas, fenóis e amônia, que podem otimizar o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos como algumas espécies de *Clostridium* e *Bacteroides* (Macfarlane e Macfarlane, 1995; Jensen, 2001).

3.3. Fisiologia digestiva do leitão pós-desmame

O desmame induz alterações agudas transitórias provavelmente relacionadas ao jejum nas primeiras semanas de creche, seguido de um período de maturação intestinal correspondente à retomada voluntária da ingestão de alimento. A maioria dessas alterações ocorre nas duas primeiras semanas pós-desmame, e tem uma estreita relação com o baixo consumo observado durante esse período (Boudry et al., 2004)

Em animais lactentes, o pH gástrico é menor quando comparado com animais desmamados. Isso se deve principalmente à redução na produção de ácido láctico pela fermentação da lactose e a baixa capacidade de secreção de ácido clorídrico no pós-desmame, reflexo da inibição da sua produção pela ação de ácido láctico (Manners, 1976; Barrow et al. 1977; Eford et al., 1982). O desmame também induz a diminuição da taxa de esvaziamento gástrico, possivelmente por ação de hormônios de estresse que inibem a motilidade do trato gastrointestinal. Outros fatores que podem estar envolvidos na taxa de esvaziamento gástrico são o consumo de ração e a composição da dieta (Martinez et al., 2004; Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007; Lallès et al., 2007).

O efeito do desmame sobre as enzimas gástricas ainda não é muito bem estabelecido. Hedemann e Jensen (2004) relataram somente a diminuição da atividade de pepsina na mucosa do estômago, enquanto a atividade da lipase foi a mesma. Em outros estudos foi relatado o aumento da atividade dessas enzimas na mucosa gástrica (Cranwell, 1985; Jensen et al., 1997).

Já foi demonstrado que 24 horas pós-desmame a altura das vilosidades diminui aproximadamente 25% em relação as vilosidades pré-desmame, e essa diminuição geralmente ocorre até o quinto dia pós-desmame. Por volta do oitavo dia pós-desmame, há um aumento na altura das vilosidades (Hampson, 1986). Esse mecanismo está relacionado com o baixo aporte energético e proteico para o animal (Hall e Byrne, 1989).

A atividade de enzimas específicas (lactase e sacarase) da borda em escova geralmente está correlacionada as mudanças na morfologia intestinal. Valores mínimos da atividade dessas enzimas foram observados quatro a cinco dias após o desmame, sendo que a atividade de lactase continuou a diminuir. Em contraste, a atividade de sacarase voltou ao normal a partir de onze dias após o desmame. A maior perda na atividade da lactase do que da sacarase foi provavelmente devido à distribuição mais apical da atividade da lactase ao longo das vilosidades (Tsuboi et al., 1981, 1985).

Em animais desmamados, as atividades da maltase II e da maltase III não mostraram alterações, mas ao longo do desenvolvimento do animal a atividade dessas enzimas aumentou, o que provavelmente pode ser explicado pela rápida indução de substrato dessas enzimas (Pluske et al., 1997).

A capacidade absorptiva ao longo do intestino também sofre alterações no desmame, quando há um aumento na absorção de glicose dependente de Na^+ no jejuno de leitões. Da mesma forma, o transporte de íons no jejuno é maior no desmame. Esses resultados foram concomitantes com atrofia das vilosidades e diminuição das atividades enzimáticas no jejuno. Em contrapartida, foi observado uma baixa capacidade absorptiva no íleo logo após o desmame (Boudry et al., 2004).

Alterações observadas no intestino grosso no desmame são pouco documentadas, porém sabe-se que a densidade das criptas intestinais diminui e o índice mitótico aumenta no ceco de leitões desmamados (Castillo et al., 2007). Além disso, o desmame causa uma redução transitória na capacidade de absorção do cólon (Boudry et al., 2004).

Jensen et al. (1997) demonstraram que, sete dias pós desmame (35 dias), a atividade enzimática em relação ao dia do desmame chega a ser até duas vezes menor, e a relação com quatro semanas pós-desmame foi até nove vezes menor, demonstrando o efeito do desmame sobre a atividade enzimática e sua evolução ao longo do tempo. Rantzer et al. (1997) sugeriram que as principais alterações na secreção pancreática exócrina em suínos ocorrem durante os primeiros dias após o desmame. A quantidade total de tripsina e quimotripsina no pâncreas e jejuno, após o desmame está diretamente relacionada com a ingestão de ração (Makkink et al., 1994).

A adaptação pancreática no pós-desmame, em relação ao perfil enzimático secretado, é dependente de diversos fatores (idade, estresse, componentes da dieta), e a secreção de cada enzima tem uma resposta diferente para cada fator (Rantzer et al., 1997). Para alguns autores a mudança no perfil de secreção pancreático é dependente da idade (Corring et al., 1978; Weström et al., 1987). No entanto, o efeito das mudanças na dieta sobre o pâncreas é o mecanismo mais provável, porque a mudança no perfil de secreção pancreático independe da idade ao desmame e sim das mudanças no perfil da dieta (Pierzynowski et al., 1993). As enzimas lipolíticas são as que sofrem maior decréscimo, fato esse que pode ser explicado pela menor taxa de gordura da dieta sólida em relação ao leite da porca (Lindemann, et al., 1986).

3.4. Estratégias nutricionais no pós-desmame para a manutenção da saúde intestinal

Ao desmame, os leitões tem a capacidade de digestão limitada principalmente de fontes de energia (amido, sacarose e gordura) e de proteína uma vez que a capacidade de secreção de enzimas proteolíticas pelo pâncreas e o sistema enzimático da borda em escova não estão totalmente desenvolvidos nessa fase (Bertol et al., 2000; Pluske et al., 2003).

A capacidade de consumo desses animais é pequena em relação as necessidades nutricionais que têm. Além disso, proteínas e frações de carboidratos que não são bem digeridos são substratos comumente utilizados por microrganismos geralmente patogênicos e responsáveis pela diarreia pós-desmame. (Kim et al., 2012). Por isso, as primeiras dietas da fase de creche devem ser adensadas, com boa palatabilidade e digestibilidade (Kummer et al., 2009).

3.4.1. Energia

Produtos lácteos, como leite em pó e soro de leite, destacam-se pelas qualidades nutricionais e excelente palatabilidade. A fração proteica contida no soro é um fator importante para alta digestibilidade e palatabilidade, mas também tem uma importante fração de imunoglobulinas. A fração proteica contida no soro de leite é importante, porém não é o fator determinante para sua inclusão nas rações para leitões desmamados, e sim a fração de lactose presente no soro que determina sua inclusão nas dietas. De modo geral, a lactose contribui para a diminuição do pH do estômago, facilitando a digestão de proteínas, além disso é uma excelente fonte energética para leitões recém-desmamados (Kummer et al., 2009).

De modo geral, a recomendação para níveis de lactose nas fases iniciais (até 49 dias de vida) é de 15% a 25%, sendo níveis maiores nas fases iniciais. Mahan et al. (2004) sugeriram, para animais desmamados aos 19 dias de idade, níveis de inclusão total de lactose de aproximadamente 25 a 30% durante a semana inicial pós-desmame, seguido por um nível de aproximadamente 20% durante o período de 7 a 21 e nível de 10 a 15% de 21 a 35 dias pós-desmame.

Também já foi demonstrado que existe influência da inclusão de lactose sobre o ganho de peso diário, consumo de ração diário e conversão alimentar em animais desmamados aos 21 dias de vida. Esse efeito foi observado nas primeiras duas semanas pós-desmame, onde os melhores resultados foram com 21% de lactose na dieta total. E os animais que receberam níveis mais altos de lactose no começo da fase foram aqueles que apresentaram melhor desempenho no período total de creche (Bertol et al., 2000).

O melhor desempenho dos animais devido a inclusão de lactose nas dietas pode ser explicado pela sua fermentação bacteriana em ácido láctico (resultando em uma diminuição do pH), o que é desfavorável para bactérias patogênicas, porém é favorável para a proliferação de bactérias comensais (Pierce et al., 2007). Além disso, a inclusão de lactose contribui para a produção de ácidos graxos voláteis, que são importantes fontes de energia para as células epiteliais do intestino (Piva et al., 2002).

Apesar da eficácia comprovada da inclusão de subprodutos à base de leite, estes podem aumentar consideravelmente o custo da dieta. Com isso já foram estudados ingredientes eficazes que podem substituir toda ou parte da lactose nas dietas iniciais como carboidratos processados, dextrose e sacarose (Mahan e Newton, 1993; Richert et al., 1996; Kim e Allee, 1997; de Rodas et al., 1998). Em animais desmamados aos 21 dias de vida, a lactose pode ser substituída em até 50% por sacarose sem a perda de desempenho dos animais (Jin et al., 1998). Lee et al. (2000) demonstraram também que animais desmamados com 21 dias de vida podem utilizar igualmente de maneira eficaz amido de milho, dextrose, lactose, glicose e sacarose.

Outras fontes de energia podem ser utilizadas nas dietas iniciais, porém a maioria dos carboidratos complexos, como o amido presente nos grãos, não é utilizada de forma eficiente em comparação com a lactose pelos leitões no pós-desmame imediato (Mahan e Newton, 1993). A hidrólise parcial de amido complexo pode melhorar seu valor nutricional para leitões (Oliver et al., 2002). Eventuais substitutos para o milho podem ser utilizados, como aveia integral, farinha de aveia, farinha de trigo, farelo de arroz, sorgo granífero, amido de batata (Rantanen et al., 1995; Hongtrakul et al., 1996; Kerr et al., 1998).

A gordura geralmente é adicionada em dietas de pós-desmame, para aumentar a densidade energética da dieta ou na tentativa de melhorar o processo de peletização, uma vez que a gordura lubrifica a parede dos furos da matriz facilitando a passagem da ração pela matriz e diminuindo a compactação da dentro da prensa (Fahrenholz, 2012).. A adição de gordura, de modo geral, melhora a conversão alimentar, mas diminui a taxa de crescimento e o consumo de ração em animais de 5 a 20 kg (Azain, 2001).

A composição de ácidos graxos fornecida tem forte influência sobre a digestibilidade de gordura nos leitões recém desmamados. Sabe-se que a digestibilidade de gorduras que contem altos níveis de ácidos graxos de cadeia curta e média ou ácidos graxos insaturados é maior do que gorduras compostas por ácidos graxos saturados de cadeia longa (Cera et al., 1988).

A utilização de gordura como fonte energética é dependente de enzimas pancreáticas e da lipase gástrica (Borgström, 1993; Jensen et al., 1997). Porém, em animais recém desmamados, há uma diminuição de até 60% na lipase pancreática (Lindemann et al. 1986; Cera et al. 1990). Isso explica a baixa resposta ou até mesmo desempenho negativo relativo a adição de gorduras nas primeiras semanas pós-desmame (Howard et al., 1990; Mahan, 1991).

3.4.2. Proteínas

Fontes de proteína para dietas pós-desmame devem ser selecionadas considerando alguns fatores, tais como, digestibilidade, palatabilidade e composição de aminoácidos. Produtos lácteos tem essas propriedades, porém sua inclusão na dieta é barrada por seu alto custo e disponibilidade no mercado. As fontes de proteína comumente usadas nas dietas iniciais são plasma seco por pulverização (*spray-dried plasma*), farinha de sangue, farinha de peixe e farelo de soja (Li et al., 2003).

O plasma é uma excelente fonte de proteínas nas dietas iniciais, sendo que sua inclusão em dietas iniciais aumenta o ganho de peso diário, consumo voluntário e melhora a conversão alimentar (Pierce et al., 2005).

Os benefícios do plasma ao desmame estão ligados principalmente à manutenção da integridade da mucosa e à redução da resposta inflamatória no intestino (Bosi et al., 2004). Além disso, o plasma contem cerca de 22% de imunoglobulinas na sua constituição, que podem auxiliar na proteção do leitão contra infecções gastrointestinais. Sendo assim, o plasma melhora a imunocompetência do leitão, muito provavelmente mediada pela IgG presente na sua constituição. A IgG evita que agentes patogênicos danifiquem a parede intestinal. De certa forma, a morfologia intestinal e a atividade enzimática são melhoradas quando animais são alimentados com dietas contendo plasma (Pierce et al., 2005).

O farelo de soja é outra fonte importante de proteína para os animais desmamados, uma vez que comparado as outras fontes de origem animal ela é mais barata, porém a taxa de crescimento e a eficiência alimentar de leitões desmamados são muito melhores com proteínas de origem animal do que com proteínas de soja. Essa queda de desempenho tem sido associada à redução da

digestibilidade proteica (Sohn et al., 1994). Além disso, os leitões desenvolvem hipersensibilidade transitória a constituintes da soja (Li et al., 1990), tais como, glicinina e β -conglucina. Além disso, a soja *in natura* tem fatores antinutricionais como inibidores de protease e lectina (Lallès, 1993). Quando a soja passa por tratamento térmico adequado, há redução da concentração de fatores antinutricionais, o que viabiliza a utilização de maneira eficaz pela maioria dos animais. Além do tratamento térmico, outros métodos de processamento podem ser aplicados, como métodos mecânicos, químicos e enzimáticos são usados para aumentar o valor nutricional da proteína de soja (Li et al., 2003).

Li et al. (1991) demonstraram que a soja extrusada promoveu ganhos similares quando comparado a dietas contendo produtos lácteos. Também foi demonstrado que o concentrado de proteína de soja ou proteína de soja isolada após a remoção de oligossacarídeos por extração com solvente pode ser usado para substituir parcialmente produtos lácteos em dietas de desmame sem efeitos negativos sobre o desempenho de leitões (Shon et al., 1994).

Leitões desmamados podem ter desempenho satisfatório quando alimentados com dietas contendo de 15 a 22% de farelo de soja, em associação com o plasma (Friesen et al., 1993). Da mesma forma, quando a dieta contém lactose há um efeito positivo no desempenho de suínos saudáveis alimentados com dietas ricas em farelo de soja (Nessmith et al., 1997). Porém, há de se atentar ao status sanitário da granja para a inclusão de farelo de soja e essa não deve ser excluída da proteína de origem animal (Kummer et al., 2009).

Outras proteínas de origem animal como farinha de sangue ou farinha de peixe podem ser usadas. A farinha de peixe selecionada pode ser usada sem perda de desempenho em níveis de até 20% para leitões recém-desmamados, porém o ponto ótimo para melhorar o ganho de peso diário é a inclusão entre 4 e 8% (Stoner et al., 1990). Já a farinha de sangue, quando bem processada, é uma importante fonte de lisina disponível para suínos (DeRouchey et al., 2002). Pode-se trabalhar com níveis de 2 a 3 % de farinha de sangue na dieta nas fases iniciais, podendo substituir até 10% de produtos lácteos (Kats et al., 1994; de Rodas et al., 1995).

O alto requerimento de aminoácidos do leitão em crescimento faz com que a dieta dos animais recém-desmamados necessite de diversas fontes de proteína. O principal aminoácido que limita a performance de suínos é a lisina (Thacker, 1999). Em geral, há uma recomendação de 20 g de lisina para cada quilo de ganho, ou seja, 1,4 a 1,12% de lisina digestível ao longo da fase de creche (Rostagno et al., 2017).

3.4.3. Aditivos

De acordo com a IN15/2009, aditivos são substâncias, microrganismos ou produtos formulados, adicionados, intencionalmente, que não são utilizadas normalmente como ingredientes, tenham ou não valor nutritivo e que melhorem as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhorem o desempenho dos animais sadios, atendam às necessidades nutricionais ou tenham efeito anticoccidiano.

3.4.3.1. Enzimas exógenas

O uso de enzimas alimentares exógenas em dietas para suínos tem como objetivo principal melhorar o valor nutritivo dos alimentos, através da eliminação de fatores antinutricionais, eliminação do efeito de encapsulamento de nutrientes ou atuando de forma sinérgica com enzimas produzidas pelos leitões. Mas, ao mesmo tempo, o uso de enzimas carboidrases tem seu uso mais concentrado na eliminação de fatores antinutricionais, associados aos polissacarídeos não

amiláceos, uma vez que a maioria dos alimentos vegetais utilizados em dietas para suínos contém uma quantidade considerável dos mesmos (de Lange et al., 2010).

3.4.3.2. Antimicrobianos

Os antimicrobianos como promotores de crescimento têm sido utilizados na suinocultura desde 1950 (Jukes et al., 1950). Atuando na eliminação ou redução de bactérias patogênicas, bem como promoção do crescimento via modulação de bactérias comensais. Em geral, os promotores de crescimento modificam a composição e a atividade da microbiota intestinal, que competem por nutrientes com o hospedeiro (Castillo et al., 2006; Rettedal et al., 2009).

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento tem como base a inibição de infecções subclínicas, redução de metabólitos microbianos tóxicos (amônia, fenóis, produtos da degradação de bile), redução do uso de nutrientes por parte dos microrganismos, principalmente os residentes do intestino delgado, reduzindo o ciclo celular e inflamação, e consequentemente, melhorando o aproveitamento de nutrientes pelo animal (Gaskins et al., 2002).

A eficiência dos antimicrobianos frente a melhoria de performance já foi comprovada em alguns estudos, demonstrando um aumento no ganho de peso, diminuição da mortalidade e melhora na conversão alimentar (Zimmerman, 1986; Hays 1987).

Atualmente a legislação brasileira proíbe o uso de avoparcina (Of. Circ. DFPA nº 047/1998), olaquinox (IN nº 11, 24/11/2004), carbadox (IN nº 35, 14/11/2005), anfenicois, tetraciclina, B-Lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (IN nº 26, 9/07/2009 e Portaria nº 193/1998), eritromicina e espiramicina (IN nº 14, 17/05/2012) e colistina (IN nº 45, 22/11/2016). Além dessas, recentemente em 2018, tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina também passaram a ser proibidas como promotores de crescimento (Portaria nº 171/2018). Poucas drogas ainda têm seu uso permitido como aditivo melhorador de crescimento, como por exemplo, o Halquinol.

O Halquinol é uma mistura de três isômeros *5, 7-dichloro-8-hydroxy quinoline*; *5-chloro-8-hydroxy quinoline* e *7-chloro-8-hydroxy quinoline*. Essa molécula demonstra boa atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, bem como sobre certos protozoários inibindo a cadeia respiratória dos mesmos por ligação em metaloproteínas de enzimas de membrana, em suínos e em aves (Jukes e Swick, 1996).

3.4.3.3. Alternativas ao uso de antimicrobianos

Apesar da capacidade evidente de melhorar o crescimento e o desempenho, há evidências de que antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento induzam a seleção de cepas bacterianas resistentes. Com isso, em diversos países já existe proibição do uso desses produtos como promotores na nutrição animal (Cairo et al., 2018).

Dentre as alternativas ao uso de antimicrobianos estão os minerais, como por exemplo, o zinco. O zinco (Zn) é um mineral essencial (micronutriente) para suínos. É um constituinte de sintetases de DNA e RNA, transferases e muitas enzimas digestivas, também tem relação direta com a ação da insulina no organismo (Heo et al., 2013). Além disso, o Zn é essencial no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, e quando animais são suplementados com altos níveis de Zn a estrutura e função intestinal são melhoradas, pelo aumento da expressão intestinal dos genes IGF-I e IGF-IR (Li et al., 2006).

Sales (2013) concluiu que suínos recém-desmamados alimentados com níveis farmacológicos de Zn aumentaram o ganho de peso diário, consumo diário de ração e melhorou a conversão alimentar. E que o aumento do consumo de ração é um dos fatores que justificam a melhora no desempenho dos animais. O efeito da suplementação de Zn sobre a microbiota, também foi reportado como um fator para explicar a melhora no desempenho dos animais (Jensen-Waern et al., 1998; Katouli et al., 1999; Højberg et al. 2005).

Leitões recém-desmamados têm o pH estomacal elevado durante essa fase (Manners, 1976; Barrow et al. 1977; Efird et al., 1982). Sabe-se que manter o pH gástrico baixo é importante para otimizar a digestão de nutrientes e prevenir o crescimento do patógeno (Heo et al., 2013). Com isso, a acidificação do trato gastrointestinal é outra estratégia para a manutenção da saúde intestinal. A adição de ácidos orgânicos nas dietas para leitões recém-desmamados, tais como fumárico, cítrico, láctico, fórmico e benzoico promovem uma melhora na performance e na saúde desses animais (Edmonds et al., 1985; Giesting e Easter, 1985; Tsiloyiannis et al., 2001; Silveira et al., 2018).

A melhora na saúde intestinal não se dá somente pela redução do pH da digesta. Warnecke e Gill (2005) demonstraram que o efeito antibacteriano de ácidos orgânicos por meio da sua capacidade de difusão na membrana celular bacteriana, com posterior dissociação no citoplasma bacteriano, eleva o pH interno e aumenta a quantidade de íons internos causando a morte celular.

O uso de probióticos na fase de desmame tem boa resposta, uma vez que, esses produtos competem com bactérias patogênicas, com isso trazendo um equilíbrio microbiano no intestino (Metzler et al. 2005). Isso se dá através da competição física por sítio de ligações no epitélio intestinal, competição por nutrientes, produção de metabólitos antibacterianos, produção de nutrientes importantes para o hospedeiro e estimulação da imunidade intestinal (Crowmwell, 2001).

As categorias de microrganismos comumente pesquisadas estão compreendidas em bactérias ácido-láticas, bacilos e leveduras (Stein and Kil, 2006). Apesar de bons resultados acerca do uso de probióticos, os resultados são inconsistentes (Li et al., 2003; Heo et al., 2013). Isso se deve ao fato de que os experimentos foram conduzidos com diferentes dosagens, tipo de cepa e condições ambientais diversas, tipo de dieta, condições de armazenamento, estratégia de alimentação e interação com antimicrobianos (Chesson, 1994; Bontempo et al., 2006).

Gibson et al. (2004) definiram prebióticos como um ingrediente fermentável seletivamente, que permite mudanças específicas na composição e na atividade da microbiota gastrointestinal que confere benefícios ao bem-estar e saúde do hospedeiro. Além disso, devem ser resistentes a acidez gástrica, a hidrólise por enzimas de mamíferos e não serem absorvidas no trato gastrointestinal; serem fermentáveis pela microbiota intestinal e capazes de selecionar o crescimento e/ou aumentar a atividade de bactérias associadas ao bem-estar e saúde do hospedeiro (Gibson et al., 1999).

Os efeitos positivos dos prebióticos são exatamente mediados pela estimulação seletiva da proliferação de bactérias associadas a um intestino equilibrado e saudável (*Bifidobacteria*, *Lactobacilli* e *Eubacteria*), bem como pelo aumento da atividade dessas bactérias (Heo et al., 2013).

Extratos naturais de ervas são ainda compostos com potencial para ser uma alternativa viável ao antimicrobianos tradicionais (Lallès et al., 2007). Dos produtos já testados estão carvacrol, cinamaldeído, timol, oleorresina de capsicum, extrato hidroalcolico de aroeira. Esses estudos demonstraram a capacidade dos extratos vegetais de promover o crescimento dos animais por meio da modulação da microbiota (Manzanilla et al. 2004; Namkung et al. 2004; Cairo et al., 2018).

Outros autores também já demonstraram a capacidade anti-helmíntica e antimicrobiana de alguns compostos presentes em extratos de ervas (Kamel, 2000; Hernández, et al., 2004). Além disso, esses compostos estão relacionados ao aumento da digestibilidade, absorção de nutrientes e efeitos imunomoduladores (Mellor, 2000).

3.5. Microbioma

A avaliação da diversidade microbiana compreende as análises dependentes e independentes de cultivo. Apesar de sua importância na microbiologia, o método dependente de cultivo consegue detectar apenas 1% dos microrganismos, uma vez que poucos são cultiváveis (Whitman et al., 1998; Torsvik et al., 2002). Já os métodos independentes de cultivo, conseguem detectar a presença desses microrganismos por técnicas de biologia molecular tendo acesso à toda microbiota de uma amostra (Schloss et al., 2009).

A partir da evolução das técnicas moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, foi possível uma melhor compreensão da microbiota residente no trato gastrointestinal de mamíferos (Ley et al., 2008). Esse gene é uma porção conservada no genoma bacteriano com regiões diferentes entre espécies bacterianas (Woese e Fox, 1977). A amplificação e sequenciamento do 16S rRNA permite a diferenciação de espécies bacterianas, e consequentemente, saber a diversidade microbiana presente em uma amostra (Wang et al., 2007).

Para avaliar a diversidade da microbiota aplicamos conceitos de diversidade alfa e beta que foram propostos em 1960 por Whittaker. A diversidade alfa é considerada uma diversidade local que considera o número de espécies presentes em um mesmo habitat ou nicho. Já diversidade beta, avalia espécies de uma forma mais global dentro de um ambiente, ou seja, avalia a mudança na composição da comunidade em relação a um gradiente de ambiente (Magurran, 2014).

De maneira geral, a microbiota de suínos é composta predominantemente por dois filos, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Há uma diferença marcante na composição antes e depois do desmame, sendo que antes os gêneros mais comuns são *Bacteroides*, *Blautia*, *Dorea*, *Escherichia* e *Fusobacterium*, e no pós-desmame os mais comuns são *Prevotella*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (Pajarillo et al., 2014; Guevarra et al., 2018; Lu et al., 2018).

Os *Lactobacillus* participam ativamente da fermentação de carboidratos complexos, gerando ácidos graxos de cadeia curta que são benéficos para os suínos, além da diminuição do pH intestinal desfavorecendo o aparecimento de bactérias potencialmente patogênicas. Já o gênero *Prevotella*, está associado à fermentação de polissacarídeos não-amiláceos derivados de plantas a ácidos graxos de cadeia curta, também pode estar associado a produção de enzimas, como β -glucanase, manase e xilanase, que podem degradar polissacarídeos na parede celular da planta (Guevarra et al., 2018).

4. Materiais e métodos

Neste trabalho, dois experimentos foram realizados para a compreensão da influência da complexidade da dieta e do uso do Halquinol sobre a histomorfologia e a microbiota intestinal. Aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – Agroceres Multimix (13104/2018).

4.1. Desempenho dos animais

Para o cálculo do ganho de peso na fase e do ganho diário de peso, os animais foram pesados individualmente a cada sete dias. O peso e o ganho de peso dos animais foram avaliados individualmente. A pesagem dos animais na montagem do experimento foi realizada em balança digital ($e= 0,02$) e as demais pesagens foram feitas em uma balança digital de hastes móveis ($e= 0,500$).

O consumo de ração foi considerado como a diferença entre a quantidade fornecida e a sobra de ração ao final de cada fase mais as eventuais sobras extras de ração que ocorreram ao longo do experimento. Este consumo foi dividido pelo número de animais na baia e pelo número de dias de duração da fase, para o cálculo do consumo de ração por animal e do consumo médio diário de ração, respectivamente.

A conversão alimentar foi calculada pela razão entre o consumo diário de ração e o ganho diário de peso das unidades experimentais.

4.2. Experimento 1

4.2.1. Animais e Locação

Foram utilizados 288 (144 machos castrados e 144 fêmeas) leitões de cruzamentos comerciais (Camborough X AGPIC 337) com 21 dias de idade. O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas Professor José Maria Lamas da Silva, em Patrocínio, MG.

Os animais foram desmamados e alocados em baias de 2,6m², com piso 100% ripado, sistema de bebedouro tipo chupeta com regulagem de altura, comedouro linear, com 19 cm por divisória e capacidade de 8 animais.

Todas as salas possuíam canaletas para escoamento de dejetos. A limpeza era realizada diariamente com a retirada dos dejetos superficiais e duas vezes por semana as canaletas eram lavadas. O setor ainda possuía sistema de aquecimento a lenha com painel controlador de temperatura. O sistema era auxiliado por lona afixada sob o teto das baias, para que se mantivesse a temperatura interna do ambiente.

4.2.2. Delineamento experimental

O experimento foi disposto em delineamento blocos casualizados, onde os animais foram divididos em blocos de acordo com a faixa de peso no início do experimento (leves, médios e pesados). Os leitões foram identificados com brincos numerados, pesados e alocados em 36 baias com água e alimento a vontade. O experimento foi composto de dois grupos experimentais com 18 repetições (baias) cada, as repetições foram formadas por oito animais, sendo quatro machos e quatro fêmeas por baia um tratado com ração com a adição de halquinol (CH) e outro tratado

com ração sem a adição de halquinol (SH). Para todos os parâmetros de desempenho a baía foi considerada a unidade experimental.

O fornecimento de ração foi feito *ad libitum* para todas as fases. O arraçoamento foi semelhante para todos os tratamentos e o consumo semanal de ração previsto para cada fase está descrito na tabela 2. A ração total a ser consumida na semana era disposta em caixas individuais para cada baía. Caso o consumo fosse maior do que o estabelecido a caixa era repostada com mais ração. Diariamente era avaliada a ocorrência de sobras de ração no chão das baias, bem como se os animais urinaram ou defecaram sobre a ração no cocho. Se houvesse sobras de ração no chão das baias ou ração molhada por urina ou fezes, essas eram recolhidas e pesadas e consideradas como sobra no cálculo de consumo de ração dos animais.

Os animais retirados do experimento devido à morte, doença não relacionada ao sistema digestivo (artrite, doença respiratória), eram pesados assim como todos os outros da baía no dia da retirada. E o consumo até o dia da retirada era contabilizado para posterior correção.

Tabela 1. Consumo de ração e divisão das fases de creche

| Período (dias) | Fase | Dias | Consumo de Ração Total (kg)/Animal |
|----------------|---------------|------|------------------------------------|
| 21-28 | Pré-Inicial 1 | 7 | 1,20 |
| 28-35 | Pré-Inicial 2 | 7 | 2,30 |
| 35-49 | Inicial 1 | 14 | 8,3 |
| 49-70 | Inicial 2 | 21 | 22,27 |

As dietas utilizadas apresentavam os mesmos níveis nutricionais, e eram compostas pelos mesmos ingredientes. As formulações dessas rações estão descritas na tabela 3 e os níveis nutricionais no anexo 1.

Tabela 2. Descrição das fórmulas das dietas Experimento 1

| Fórmula | Pré-Inicial 1 | Pré-Inicial 2 | Inicial 1 | Inicial 2 |
|----------------------------------------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Milho Grão 7.5% PB | 220 | 374 | 452 | 520 |
| Soja Farelo 46%PB | 80 | 170 | 220 | 300 |
| Óleo de Soja Degomado | 0 | 0 | 20 | 20 |
| Cereais pré-gelatinizados (Milho, Bolacha e Arroz) | 150 | 100 | 50 | 0 |
| Farelo Bolacha | 98 | 11 | 20 | 50 |
| Farinha de origem animal (Peixe, plasma, ovo e vísceras) | 135 | 110 | 80 | 2 |
| Derivados lácteos (soro e leite) | 220 | 125 | 60 | 0 |
| Levedura hidrolizada/ parede de levedura /nucleotídeos | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Açúcar | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Sal | 1.5 | 2.8 | 3.3 | 5.5 |
| Fosfato Bicálcico | 0 | 6 | 8 | 10 |
| Calcário Calcítico | 0 | 1.5 | 3 | 8 |
| L-Lisina 78% | 2.60 | 2.76 | 2.93 | 4.21 |
| DL-Metionina 70% | 1.27 | 1.24 | 1.26 | 1.75 |

| | | | | |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| L-Treonina 98% | 1.14 | 1.16 | 1.54 | 1.88 |
| L-Triptofano 98% | 0.21 | 0.17 | 0.34 | 0.35 |
| Valina 96.5% | 0.11 | 0.03 | | |
| Blend de Enzimas Protease e Carbohidrases | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Blend de ácidos orgânicos | 13.50 | 14.50 | 6.50 | 2.00 |
| Prebióticos / probióticos | 15.00 | 18.00 | 10.00 | 10.00 |
| Carvacrol 12% | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Adsorvente de Micotoxinas | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| PX vitamínico / Mineral | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| Halquinol 60%* | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Total (Kg) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

* Inclusão somente no tratamento CH.

4.2.3. Morfometria Intestinal

Para a análise de histomorfometria foram selecionados 12 animais de cada grupo experimental, em dois períodos diferentes, aos 42 dias de vida (6 animais de cada grupo) e aos 70 dias de vida (6 animais de cada grupo).

Os animais foram eutanasiados por meio de insensibilização por eletronarcose seguida de sangria, conforme estabelecido na Resolução N° 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Na necropsia foram coletados, de cada animal, fragmentos de jejuno de aproximadamente 4 cm de comprimento, e a 1,70 m do estômago, abertas pela borda mesentérica, lavadas, estendidas pela túnica serosa, fixadas em solução de formol tamponado a 10% em frascos de plástico opaco e devidamente identificados para posterior processamento.

Os fragmentos foram lavados em álcool etílico a 70% e, posteriormente, desidratadas em série crescente de álcoois. Após desidratação, os fragmentos foram incluídos em parafina, de modo a se obter cortes longitudinais da mucosa intestinal. Após a inclusão, o material foi seccionado, obtendo-se secções de 3 µm de espessura, para a montagem das lâminas. As secções foram coradas com a técnica de coloração de Hematoxilina-Eosina.

Imagens das secções histológicas foram capturadas diretamente do fotomicroscópio (Leica DM 4000 B), com a objetiva de 10X. Os índices morfométricos foram determinados utilizando-se o programa de análise de imagens Leica Application Suite (LAS). As variáveis morfométricas analisadas foram a altura de vilosidades, que corresponde a porção superior as criptas, percorrendo-a longitudinalmente até seu ápice, e profundidade das criptas, da sua base até a região de transição cripta-vilo, e a razão entre a altura da vilosidade e profundidade da cripta. Foram selecionadas 30 vilosidades/criptas por secção histológica.

4.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados considerando a baía como unidade experimental para os parâmetros de desempenho e o animal para os parâmetros de morfologia intestinal. As pressuposições de normalidade e homocedasticidade foram verificadas

por meio do teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente a um nível de significância de 0,05 e, quando necessário, realizou-se transformação logarítmica. Todos os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste T, considerando o tratamento como fator principal. As médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software R (R Core Team, 2018).

4.3. Experimento 2

4.3.1. Animais e Locação

Foram utilizados 192 (96 machos castrados e 96 fêmeas) leitões de cruzamentos comerciais (Camborough X AGPIC 337) com 21 dias de idade. O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas Professor José Maria Lamas da Silva, em Patrocínio MG.

Os animais foram desmamados e alocados em baias de 2,6m², com piso 100% ripado, sistema de bebedouro tipo chupeta com regulagem de altura, comedouro linear, com 19 cm por divisória e capacidade de 8 animais.

Todas as salas possuíam canaletas para escoamento de dejetos. A limpeza era realizada diariamente com a retirada dos dejetos superficiais e duas vezes por semana as canaletas eram lavadas. O setor ainda possuía sistema de aquecimento a lenha com painel controlador de temperatura. O sistema era auxiliado por lona afixada sob o teto das baias, para que se mantivesse a temperatura interna do ambiente.

4.3.2. Delineamento experimental

O experimento foi disposto em delineamento blocos casualizados, onde os animais foram divididos em blocos de acordo com a faixa de peso (leves, médios e pesados) no início do experimento. Os leitões foram identificados com brincos numerados, pesados e alocados em 24 baias com água e alimento a vontade. O experimento era composto de dois grupos experimentais com 12 repetições (baias) cada, cada repetição foi formada por oito animais, sendo quatro machos e quatro fêmeas por baia., um tratado com ração de baixa complexidade (BC) e outro tratado com ração de alta complexidade (AC). Para todos os parâmetros de desempenho a baia foi considerada a unidade experimental.

O fornecimento de ração foi feito *ad libitum* e para todas as fases. O tratamento A foi composto de três fases e o tratamento B composto de 4 fases (tabela 6), porém o consumo previsto se manteve igual para os tratamentos (tabelas 7 e 8). A ração total a ser consumida na semana era disposta em caixas individuais para cada baia. Caso o consumo fosse maior do que o estabelecido a caixa era repostada com mais ração. Diariamente deve ser avaliada a ocorrência de sobras de ração no chão das baias, bem como se os animais urinaram ou defecaram sobre a ração no cocho. Se houvesse sobras de ração no chão das baias bem como ração molhada por urina ou fezes, essas eram recolhidas e pesadas e foram consideradas como sobra no cálculo de consumo de ração dos animais.

Tabela 3. Esquema de fases para cada tratamento

| TRATAMENTO | PRÉ-INICIAL 1 | PRÉ-INICIAL 2 | INICIAL 1 | INICIAL 2 |
|------------|-----------------|---------------|-----------|-----------|
| BC | 14 dias (única) | | 14 dias | 21 dias |
| AC | 7 dias | 7 dias | 7 dias | 28 dias |

Os animais retirados do experimento devido à morte, doença ou refugagem, eram pesados assim como todos os outros da baía no dia da retirada. E o consumo até o dia da retirada era contabilizado para posterior correção.

Tabela 4. Consumo de ração tratamento BC

| Período (dias) | Fase | Dias | Consumo de Ração Total (kg)/Animal |
|----------------|-------------------|------|------------------------------------|
| 21-35 | Pré-Inicial Única | 14 | 4,50 |
| 35-49 | Inicial 1 | 14 | 9,00 |
| 49-70 | Inicial 2 | 21 | 23,00 |

Tabela 5. Consumo de ração tratamento AC

| Período (dias) | Fase | Dias | Consumo de Ração Total (kg)/Animal |
|----------------|---------------|------|------------------------------------|
| 21-28 | Pré-Inicial 1 | 7 | 1,50 |
| 28-35 | Pré-Inicial 2 | 7 | 3,00 |
| 35-42 | Inicial 1 | 7 | 4,00 |
| 42-70 | Inicial 2 | 28 | 28,00 |

As dietas fornecidas tinham conceitos diferentes, sendo a tratamento A um conceito de baixo investimento e baixa complexidade com níveis nutricionais basais e o tratamento B com um conceito de alto investimento e alta complexidade e níveis nutricionais acima dos recomendados. As formulações dessas rações estão descritas na tabela 6 e os níveis nutricionais no anexo 2.

Tabela 6. Descrição das fórmulas das dietas Experimento 2

| Dieta Baixa Complexidade | | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Fórmula | Ração Pré Ini 2 | Ração Sui Ini 1 | Ração Ini 2 |
| Milho Grao 7.5% PB | 396.28 | 491.43 | 597.07 |
| Soja Farelo 46%PB | 214.00 | 323.50 | 345.00 |
| Soja Proteína Texturizada 52%PB | 30.00 | 25.00 | ----- |
| Derivados lácteos (Soro e Permeado) | 250.00 | 90.00 | ----- |
| Peixe Farinha 55%PB | 40.00 | 5.00 | ----- |
| Soja Oleo Degomado 95%EE | 35.00 | 15.00 | 15.00 |
| Fosfato 20% | 5.25 | 15.75 | 9.45 |
| Calcio Calcario 36% | 5.50 | 8.50 | 10.50 |
| Sodio Cloreto 38% | 3.50 | 6.00 | 5.00 |
| L-Lisina 78% | 4.25 | 4.80 | 4.35 |
| DL-Metionina 70% | 2.85 | 3.10 | 2.59 |
| L-Treonina 98% | 2.25 | 2.65 | 2.24 |
| L-Triptofano 98% | 0.55 | 0.35 | 0.25 |
| Valina 96.5% | 1.60 | 1.55 | 1.05 |
| Colina Cloreto 70% | 0.08 | 0.08 | ----- |
| Cobre Sulf Pentahid 25%, | ----- | 0.25 | 0.25 |

| | | | |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| Px Vitaminico Mineral | 3.34 | 3.34 | 3.05 |
| Zinco, óxido 79,9% | 3.75 | 2.50 | ----- |
| Fitase 5.000 FTU/g | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Florfenicol 2% | ----- | ----- | 3.00 |
| Amoxicilina 50% | 0.60 | ----- | ----- |
| Halquinol 60% | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Total | 1000.000 | 1000.000 | 1000.000 |

Dieta Alta Complexidade

| Fórmula | Pré-Inicial 1 | Pré-Inicial 2 | Inicial 1 | Inicial 2 |
|----------------------------------------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Milho Grão 7.5% PB | 220 | 374 | 452 | 520 |
| Soja Farelo 46%PB | 80 | 170 | 220 | 300 |
| Soja Óleo Degomado | 0 | 0 | 20 | 20 |
| Cereais pré-gelatinizados (Milho, Bolacha e Arroz) | 150 | 100 | 50 | 0 |
| Farelo Bolacha | 98 | 11 | 20 | 50 |
| Farinha de origem animal (Peixe, plasma, ovo e vísceras) | 135 | 110 | 80 | 2 |
| Derivados lácteos (soro e leite) | 220 | 125 | 60 | 0 |
| Levedura hidrolizada/ parede de levedura /nucleotídeos | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Açúcar | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Sal | 1.5 | 2.8 | 3.3 | 5.5 |
| Fosfato Bicálcico | 0 | 6 | 8 | 10 |
| Calcário Calcítico | 0 | 1.5 | 3 | 8 |
| L-Lisina 78% | 2.60 | 2.76 | 2.93 | 4.21 |
| DL-Metionina 70% | 1.27 | 1.24 | 1.26 | 1.75 |
| L-Treonina 98% | 1.14 | 1.16 | 1.54 | 1.88 |
| L-Triptofano 98% | 0.21 | 0.17 | 0.34 | 0.35 |
| Valina 96.5% | 0.11 | 0.03 | | |
| Blend de Enzimas Protease e Carbohidrases | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Blend de ácidos orgânicos | 13.50 | 14.50 | 6.50 | 2.00 |
| Prebióticos / probióticos | 15.00 | 18.00 | 10.00 | 10.00 |
| Carvacrol 12% | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Adsorvente de Micotoxinas | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| PX vitamínico / Mineral | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| Florfenicol 2% | ----- | ----- | ----- | 3.00 |
| Amoxicilina 50% | 0.60 | ----- | ----- | ----- |
| Halquinol 60% | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Total (Kg) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

4.3.3. Microbioma

4.3.3.1. Amostras

Foram selecionados 10 animais de cada grupo experimental e as fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais nos dias 0, 21 e 49 do experimento, 21, 42 e 70 dias de vida, respectivamente. Essas amostras ficaram congeladas a -80°C até o processamento.

4.3.3.2. Sequenciamento 16s

O DNA total foi extraído a partir de 200 mg de amostras fecais utilizando um kit comercial (DNA QIAmp de fezes Mini Kit, Qiagen Inc., Toronto, Ontário), seguindo as recomendações do fabricante. Após extraído, o DNA foi quantificado utilizando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit® ds DNA Hs Assay Kit (Life Technologies).

Para sequenciamento genômico, foi realizado o método “Fusion” desenvolvido para análise do microbioma utilizando o sequenciamento de nova geração pelo Ion Torrent 16S Metagenomics kit que amplifica a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA.

Os iniciadores foram customizados com 1 primer reverso e 96 primers diretos com barcodes, como descrito no anexo 1. A região V4 hipervariável do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os iniciadores de fusão (Bokulich, et al., 2012; Bokulich, et al., 2013). Os iniciadores de fusão continham a sequência com tags para os “barcodes” a sequência do primer propriamente dito e um adaptador para ligação (anexo 3).

Para reação de PCR inicial foi utilizado 1x Platinum® PCR SuperMix High Fidelity; 5 µM de cada iniciador de fusão; com DNA genômico entre 20-50 ng e água deionizada estéril. Os ciclos utilizados foram 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 ° C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 30 segundos, anelamento à 58 °C por 30 segundos e extensão a 68 ° C durante 1 min / kb.

Os produtos de PCR foram confirmados utilizando QiAxccl Advanced System (Qiagen) e purificados com Agencourt® AMPure XP Reagent (Beckman Coulter) e, posteriormente, quantificado usando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) e reajustadas para concentração final de 26 pM.

A PCR de emulsão foi realizada fazendo a quebra de emulsão e o enriquecimento utilizando o kit OTON OT-Q™ Ion PGM™ (# A29900), de acordo com as instruções do fabricante, como descrito brevemente. Uma concentração de uma cópia molde / Partícula Esfera de Íon (ISP) compõe a emulsão de PCR utilizando OT2 (Life Technologies). Em seguida, os ISPs foram recuperados e as contas Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Life Technologies) foram usadas para enriquecer para ISPs positivos para modelos. A amostra foi preparada para sequenciamento usando o Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (# A30044). Cada amostra composta foi carregada em um chip Ion 318 e sequenciada no sistema PGM (*Personal Genome Machine*) para 850 fluxos.

Para determinar a qualidade, foram utilizadas duas comunidades microbianas 16S sintéticas (Mock Communities) de espécies com genomas conhecidos. A primeira comunidade, o HMD-782D contém 20 estirpes bacterianas com 100.000 cópias por organismo por µL. O segundo é HMD783D, que contém 20 cepas bacterianas variando entre 1.000 a 1.000.000 de cópias por organismo por µL. Ambos os reagentes foram obtidos através de BEI Resources, NIAID, NIH como parte do Projeto Microbioma Humano: DNA Genômico da Microbial Mock Community B (Even, Low Concentration), v5.1L, para 16S RNA Gene Sequencing, HM-782D e Genomic DNA

de Microbial Mock Community B (Staggered, Low Concentration), v5.2L, para 16S rRNA Gene Sequencing, HM-783D.

4.3.3.3. Análises de bioinformática

Com as sequências brutas, as amostras foram trabalhadas conforme o pipeline de classificação de OTU proveniente no pipeline de análise de dados do Projeto de microbioma brasileiro (Pylro et al., 2014).

Na primeira etapa, os dados brutos foram filtrados utilizando um script próprio (disponível em: https://github.com/aquacen/fast_sample) com os parâmetros: "-n 100" (para todas as reads), "-s 160" (inclua apenas reads \geq 160 pb), "-b 310" (para trinar as reads \geq 310 pb), "-l 0" (no left clip) e "-q 20" (para trinar as reads 3' com qualidade no Phred de <20). A próxima etapa consistiu na utilização do software Uparse (Edgar, 2013) foi usado para rotular as reads e Usearch (versão de uso 10.0.240) (Edgar, 2017) para filtrar por qualidade (-fastq_filter -fastq_maxee 0.8), retirar reads replicadas (-fastx_uniques -sizeout), organizar por tamanho (-sortbysize -minsize 2), organizar por grupos de OTU (-cluster_otus), montar mapa de dados brutos sobre OTU's (-usearch_global -strand plus -id 0.97). Para gerar a lista de OTU's e converter os arquivos em uma tabela de OTU's foi utilizado o Uparse e a primeira versão do software QIIME (Caporaso et al., 2010) foi usada para executar e atribuir taxonomia (--similarity 0.7), alinhar as sequências OTU e construir a árvore filogenética. Finalmente, a versão de software Biom 2.1.5 (McDonald et al., 2012) foi usada para: converter o Biom table json, adicionar metadados de taxonomia no QIIME (--observation-header OTUID, taxonomy, confidence --sc-separated taxonomy --float-fields confidence) e organizar tabela de OTU. O programa Usearch na versão 10.0.240 inclui filtros de quimera no passo de formação dos clusters de OTU (-cluster_otus). Os dois "barcodes" com comunidades "Mock" foram avaliados usando os mesmos passos.

4.3.4. Análise estatística

Para os dados de desempenho produtivo, o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados considerando a baía como unidade experimental para os parâmetros de desempenho. As pressuposições de normalidade e homocedasticidade foram verificadas por meio do teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente a um nível de significância de 0,05 e, quando necessário, realizou-se transformação logarítmica dos dados. Posteriormente procedeu-se a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste T, considerando o tratamento como fator principal. As médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

Para o microbioma, o banco de dados foi analisado e filtrado previamente quanto à presença de características de baixa abundância e variância da média e desvio padrão, respectivamente, utilizando o processo segundo QIIME, com o propósito de remover dados pouco informativos ou de baixa qualidade e melhorar as condições da análise subsequente. Posteriormente, o pressuposto de normalidade foi verificado e os dados foram transformados para base logarítmica (*relative log expression*). Alfa diversidade foi analisada empregando-se o índice Shannon para diversidade e Chao1 para riqueza, calculados pelo QIIME, e posteriormente comparada por análise de variância seguindo esquema fatorial 2x3 sendo considerados como fatores as duas dietas (BC e AC) e os três períodos avaliados (21, 42 e 70 dias), bem como suas respectivas interações. O sequenciamento foi analisado a nível taxonômico (filo e gênero) por meio de análise de variância e as médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste T. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software R (R Core Team, 2018). As médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Experimento 1

5.1.1. Peso e ganho de peso diário

Não houve diferença nos pesos de entrada no experimento. Ao longo das duas primeiras fases pré-iniciais também não houve diferença no peso. Somente a partir da fase Inicial 1 houve diferença no peso entre os grupos, 11,83 kg no tratamento CH e 11,36 kg no tratamento SH aos 42 dias, 16,39 kg no tratamento CH e 15,32 kg no tratamento SH aos 49 dias. O peso final foi de 33,22 kg para o tratamento CH e 31,83 kg para o tratamento SH. Os resultados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Peso (kg) médio dos animais ao final de cada fase de tratamento

| Idade (dias) | Tratamento | | EPM* | Valor de P |
|--------------|------------|-------|------|------------------|
| | CH | SH | | |
| 21 | 6.55 | 6.55 | 0.14 | 0.993 |
| 28 | 6.84 | 6.79 | 0.15 | 0.453 |
| 35 | 8.83 | 8.62 | 0.17 | 0.058 |
| 42 | 11.83 | 11.36 | 0.19 | 0.037 |
| 49 | 16.39 | 15.32 | 0.27 | <0.001 |
| 70 | 33.22 | 31.83 | 0.55 | 0.011 |

*Erro padrão da média

Para o ganho de peso diário, o mesmo comportamento do peso foi observado. Somente a partir da fase Inicial 1 houve diferença entre os grupos, sendo 0,252 kg para o tratamento CH e 0,229 kg para o tratamento SH no período de 21 a 42 dias, 0,352 kg para o tratamento CH e 0,313 kg para o tratamento SH no período de 21 a 49 dias. Ao final do experimento 0,544 kg para o tratamento CH e 0,516 para o tratamento SH. Os resultados estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Ganho de peso (kg) acumulado de 21 dias até o final da fase

| Período (dias) | Tratamento | | EPM* | Valor de P |
|----------------|------------|-------|-------|------------------|
| | CH | SH | | |
| 21 – 28 | 0.042 | 0.035 | 0.004 | 0.927 |
| 21 – 35 | 0.163 | 0.148 | 0.004 | 0.059 |
| 21 – 42 | 0.252 | 0.229 | 0.005 | 0.037 |
| 21 – 49 | 0.352 | 0.313 | 0.007 | <0.001 |
| 21 – 70 | 0.544 | 0.516 | 0.009 | 0.011 |

*Erro padrão da média

5.1.2. Consumo diário de ração

O consumo de ração diário foi semelhante para ambos os tratamentos nas fases pré-iniciais e não houve diferença estatística entre os mesmos. Já na fase inicial 1 houve diferença entre grupos, sendo o consumo no período de 21 a 42 dias foi de 0,331 para o tratamento CH e 0,311 para o tratamento SH, e no período de 21 a 49 dias foi de 0,446 para o tratamento CH e de 0,425 para o tratamento SH. O consumo de 21 a 70 não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os resultados estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Consumo de Ração diário acumulado por animal (kg)

| Período (dias) | Tratamento | | EPM* | Valor de P |
|----------------|------------|-------|-------|--------------|
| | CH | SH | | |
| 21 – 28 | 0.095 | 0.095 | 0.004 | 0.995 |
| 21 – 35 | 0.209 | 0.198 | 0.005 | 0.190 |
| 21 – 42 | 0.331 | 0.311 | 0.005 | 0.006 |
| 21 – 49 | 0.446 | 0.425 | 0.007 | 0.047 |
| 21 – 70 | 0.787 | 0.770 | 0.011 | 0.221 |

*Erro padrão da média

5.1.3. Conversão alimentar

A conversão alimentar acumulada foi diferente somente ao final da fase Inicial 1 que foi de 1,27 para o tratamento CH e 1,36 para o tratamento SH. Sendo que a conversão final para o período

do experimento foi de 1,45 para o tratamento CH e 1,50 para o tratamento SH, sem diferença estatística entre os mesmos. Os resultados estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. Conversão alimentar acumulada dos tratamentos CH e SH

| Período (dias) | Tratamentos | | EPM* | Valor de P |
|----------------|-------------|------|------|------------|
| | CH | SH | | |
| 21 – 28 | 2.20 | 2.11 | 0.10 | 0.658 |
| 21 – 35 | 1.28 | 1.34 | 0.02 | 0.070 |
| 21 – 42 | 1.33 | 1.37 | 0.02 | 0.290 |
| 21 – 49 | 1.27 | 1.36 | 0.02 | 0.010 |
| 21 – 70 | 1.45 | 1.50 | 0.01 | 0.066 |

*Erro padrão da média

5.1.4. Morfometria Intestinal

Dentre as variáveis morfométricas avaliadas, altura de vilosidade, profundidade de cripta e a relação entre altura de vilosidade e profundidade de cripta, não foram observadas diferenças entre os tratamentos em nenhum dos momentos de coleta. Os resultados estão descritos na tabela 11.

Tabela 11. Altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação entre altura de vilosidade e profundidade de cripta (AV:PC) aos 42 e 70 dias de vida

| | Tratamentos | | EPM* | Valor de P |
|-------------------------|-------------|--------|-------|------------|
| | CH | SH | | |
| <i>42 dias de idade</i> | | | | |
| Altura de Vilosidade | 401.50 | 407.92 | 8.64 | 0.729 |
| Profundidade de Cripta | 147.89 | 142.42 | 6.42 | 0.260 |
| AV : PC | 2.79 | 2.98 | 0.11 | 0.425 |
| <i>70 dias de idade</i> | | | | |
| Altura de Vilosidade | 420.18 | 422.26 | 18.39 | 0.958 |
| Profundidade de Cripta | 195.33 | 193.79 | 5.93 | 0.904 |
| AV : PC | 2.23 | 2.24 | 0.04 | 0.170 |

*Erro padrão da média

5.2. Experimento 2

5.2.1. Peso e ganho de peso diário

O peso dos animais no início do estudo foi igual para ambos tratamentos. Aos 28 dias de idade dos animais foi diferente onde o grupo AC teve desempenho superior, 6,76 kg e 7,23 kg, tratamento BC e AC respectivamente. Porém, o desempenho se igualou até o final do experimento. Os resultados estão expressos na tabela 12.

Tabela 12. Peso (kg) médio dos animais

| Idade (dias) | Tratamentos | | EPM* | Valor de P |
|--------------|-------------|-------|------|------------------|
| | BC | AC | | |
| 21 | 6.35 | 6.44 | 0.21 | 0.384 |
| 28 | 6.76 | 7.23 | 0.23 | <0.001 |
| 42 | 11.32 | 11.76 | 0.36 | 0.134 |
| 70 | 30.82 | 31.86 | 0.67 | 0.135 |

*Erro padrão da média

Aos 28 dias de idade dos animais, o ganho de peso também foi diferente entre os tratamentos, os animais do tratamento AC ganharam 0,113 kg enquanto os do tratamento BC somente 0,059 kg. Porém, ao final do experimento o desempenho se igualou. Os resultados estão expressos na tabela 13.

Tabela 13. Ganho de peso (kg) acumulado a partir dos 21 dias

| Período (dias) | Tratamentos | | EPM* | Valor de P |
|----------------|-------------|-------|-------|------------------|
| | BC | AC | | |
| 21 – 28 | 0.059 | 0.113 | 0.008 | <0.001 |
| 21 – 42 | 0.237 | 0.253 | 0.009 | 0.232 |
| 21 – 70 | 0.499 | 0.519 | 0.010 | 0.160 |

*Erro padrão da média

5.2.2. Consumo diário de ração

O consumo de ração diário por animal foi superior no tratamento AC no período de 21 a 42 dias, 0,350 kg, e de 0,299 kg no tratamento BC ($P < 0,05$). Não houve diferença estatística nos demais períodos. Os resultados estão expressos na tabela 14.

Tabela 14. Consumo de ração diário por animal (kg)

| Período | Tratamentos | | EPM* | Valor de P |
|---------|-------------|-------|-------|--------------|
| | BC | AC | | |
| 21 – 28 | 0.111 | 0.150 | 0.008 | 0.011 |
| 21 – 42 | 0.299 | 0.350 | 0.013 | 0.031 |
| 21 – 70 | 0.728 | 0.794 | 0.019 | 0.052 |

*Erro padrão da média

5.2.3. Conversão alimentar

A conversão alimentar acumulada foi diferente no período de 21 a 42 dias, e foi de 1,28 para o tratamento BC e 1,38 para o tratamento AC. E a conversão final também foi melhor no tratamento BC com 1,46 e 1,53 no tratamento AC ($P < 0,05$). Os resultados estão descritos na tabela 15.

Tabela 15. Conversão alimentar acumulada dos tratamentos BC e AC

| Período | Tratamentos | | EPM* | Valor de P |
|---------|-------------|------|------|--------------|
| | BC | AC | | |
| 21 – 28 | 1.88 | 1.37 | 0.09 | 0.013 |
| 21 – 42 | 1.28 | 1.38 | 0.02 | 0.008 |
| 21 – 70 | 1.46 | 1.53 | 0.02 | 0.013 |

*Erro padrão da média

5.2.4. Microbioma

Não houve diferença estatística de diversidade e riqueza da microbiota entre os tratamentos nos três momentos de coleta (Figuras 1 e 2 e tabela 16).

O efeito do tratamento sobre a idade teve efeito positivo sobre a diversidade. O tratamento BC foi diferente somente na terceira (70 dias de idade) coleta que teve o maior índice de diversidade, já no tratamento AC a segunda coleta (42 dias de idade) foi igual a primeira (21 dias de idade) e a terceira coletas (70 dias de idade), porém a primeira e a terceira coletas foram diferentes entre si (Figura 3 e Tabela 16).

O mesmo efeito foi observado na riqueza das amostras onde, no tratamento BC, houve diferença estatística entre a segunda coleta, com menor riqueza, e a primeira e terceira coleta, com riquezas semelhantes. Já o tratamento AC todas as coletas se diferiram, sendo que a maior riqueza foi observada na terceira coleta, seguida da primeira coleta e, por fim, a com menor riqueza a segunda coleta (Figura 4 e Tabela 16).

Tabela 16. Riqueza e diversidade da comunidade microbiana fecal de leitões em fase de creche.

| Idade | 21 dias | | 42 dias | | 70 dias | | EPM* | Valor de P | | |
|-------------|---------|------|---------|------|---------|------|-------|------------|----------------|--------------|
| | BC | AC | BC | AC | BC | AC | | Tratamento | Idade | T x I |
| Riqueza | 730 | 630 | 390 | 488 | 844 | 782 | 28,31 | 0,758 | < 0,001 | 0,023 |
| Diversidade | 4,16 | 3,70 | 3,65 | 3,96 | 4,70 | 4,34 | 0,08 | 0,506 | < 0,001 | 0,029 |

*Erro padrão da média

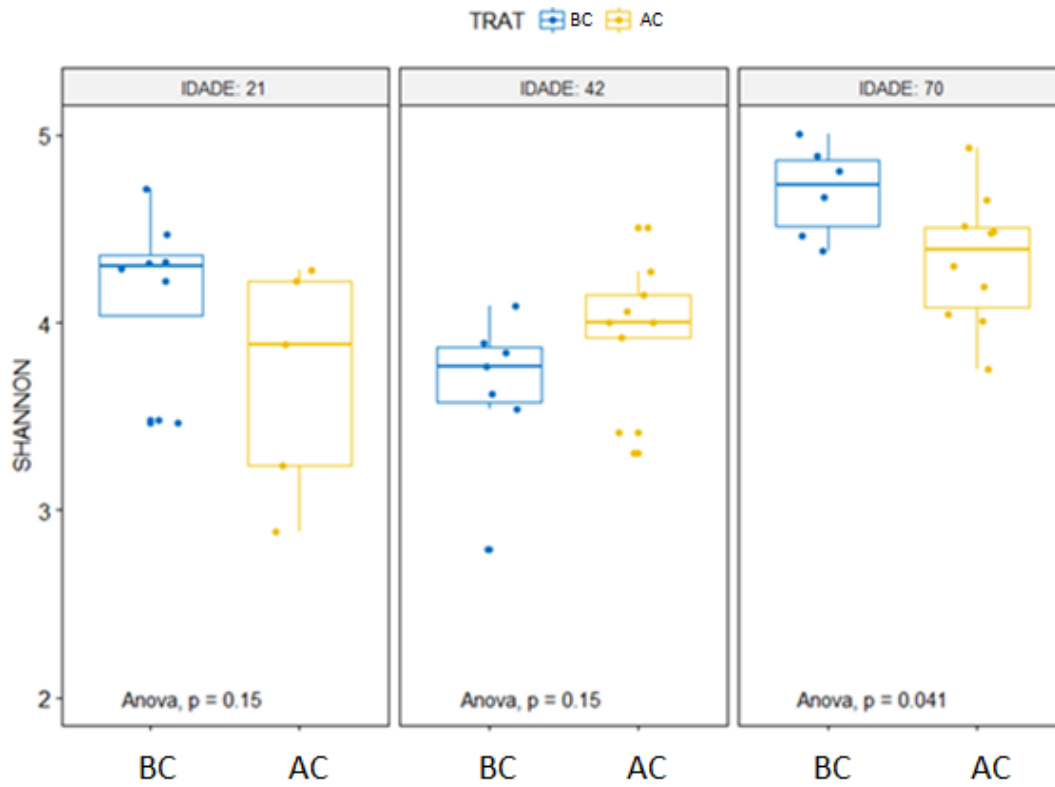


Figura 1. Índice Shanon (Diversidade) – Comparação da diversidade entre os tratamentos nos diferentes momentos de coleta 21, 42 e 70 dias de idade. Não houve diferença estatística entre os grupos.

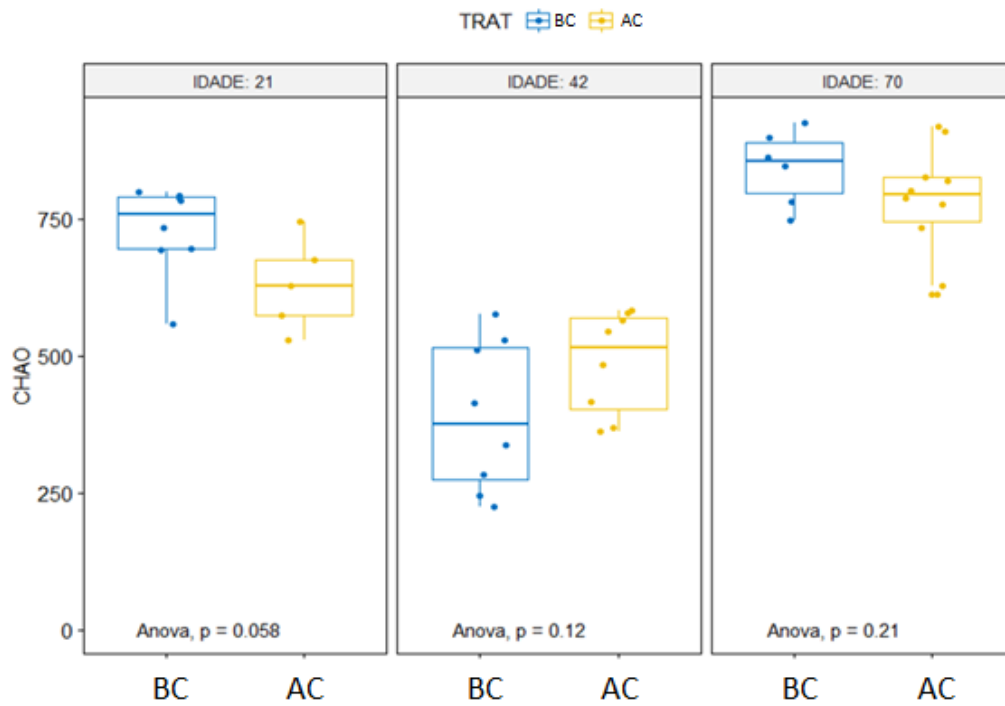


Figura 2. Índice Chao (Riqueza) – Comparação da riqueza entre os tratamentos nos diferentes momentos de coleta 21, 42 e 70 dias de idade. Não houve diferença estatística entre os grupos.

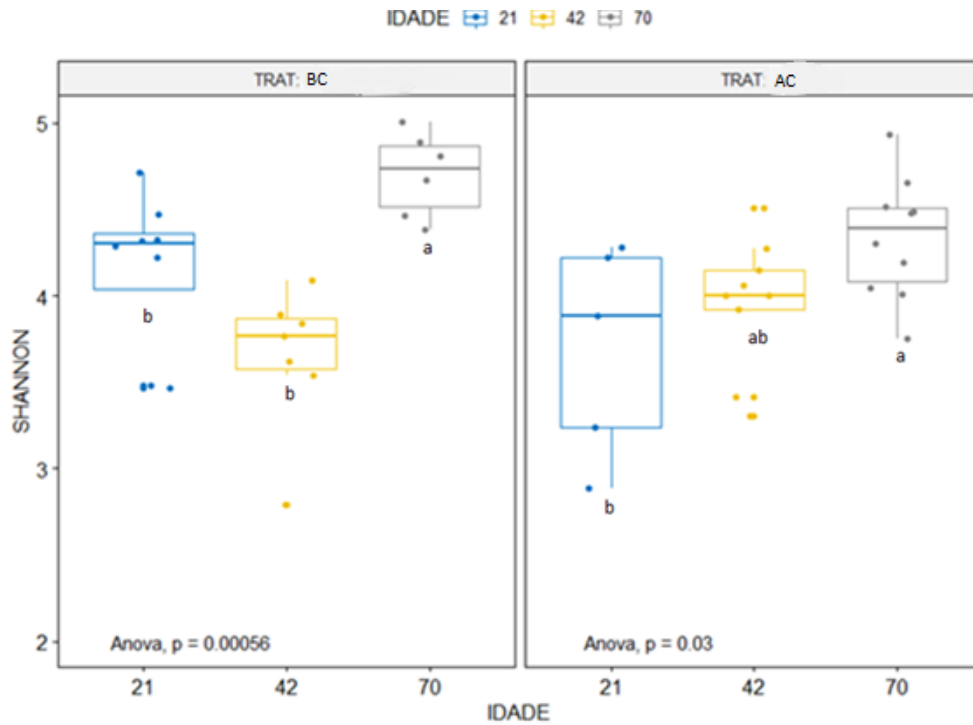


Figura 3. Índice Shanon (Diversidade) – Comparação da diversidade entre os diferentes momentos da coleta dentro de cada tratamento. No tratamento BC, houve diferença estatística entres as duas primeiras coletas e a última coleta que foi a coleta que apresentou a maior diversidade. Já no tratamento AC a segunda coleta foi igual a primeira e a terceira coletas, porém a primeira e a terceira coletas foram diferentes entre si.

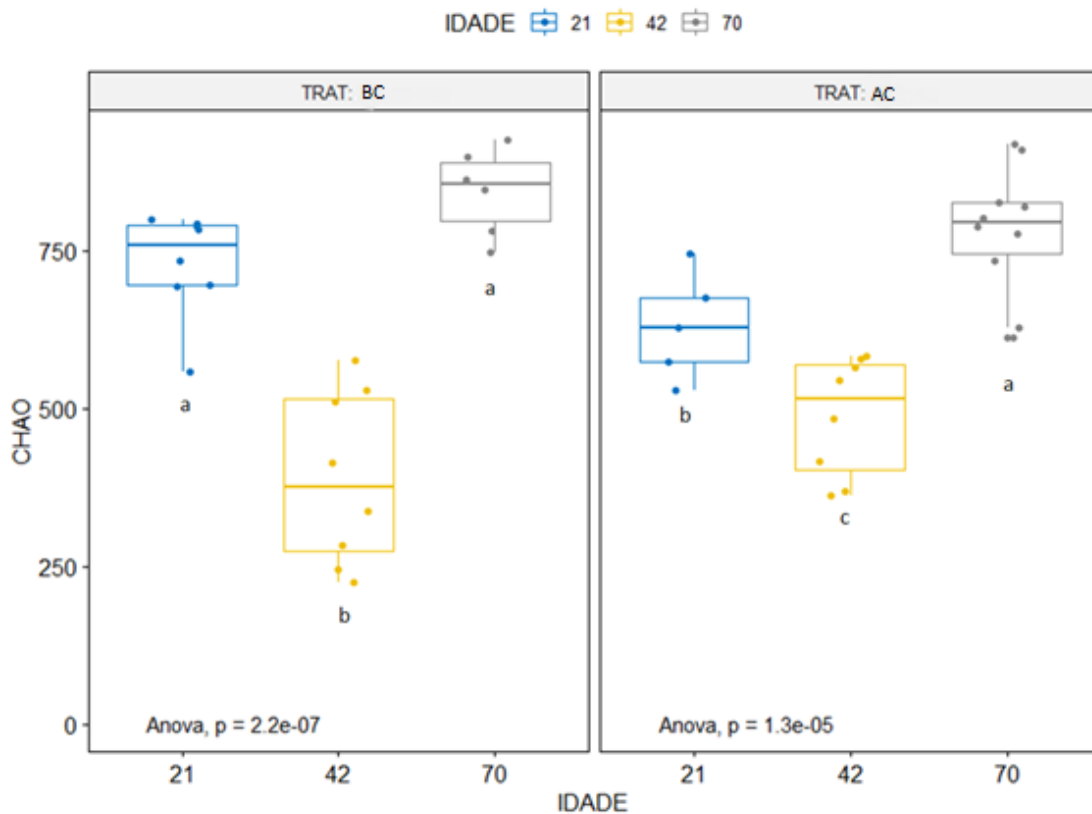


Figura 4. Índice Chao (Riqueza) – Comparação da riqueza entre os diferentes momentos da coleta dentro de cada tratamento. No tratamento BC, a segunda coleta foi a coleta com menor riqueza, e a primeira e terceira coletas com riquezas semelhantes. No tratamento AC todas as coletas foram diferentes estatisticamente com a maior riqueza na terceira coleta, seguida pela primeira coleta e segunda coleta.

Aos 42 dias os gêneros que diferiram entre os tratamentos foram Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Bulleidia, Bacteriodes e Lachnospira. Sendo os gêneros Eubacterium, Lactobacillus e Bacteriodes mais prevalentes nos animais do tratamento BC (Anexo 4, Figura 5).

Aos 70 dias os gêneros que diferiram entre os tratamentos foram Coprococcus, Mitsuoella, Dehalobacterium. Somente a Mitsuoella foi mais prevalente no tratamento AC (Anexo 4, Figura 6).

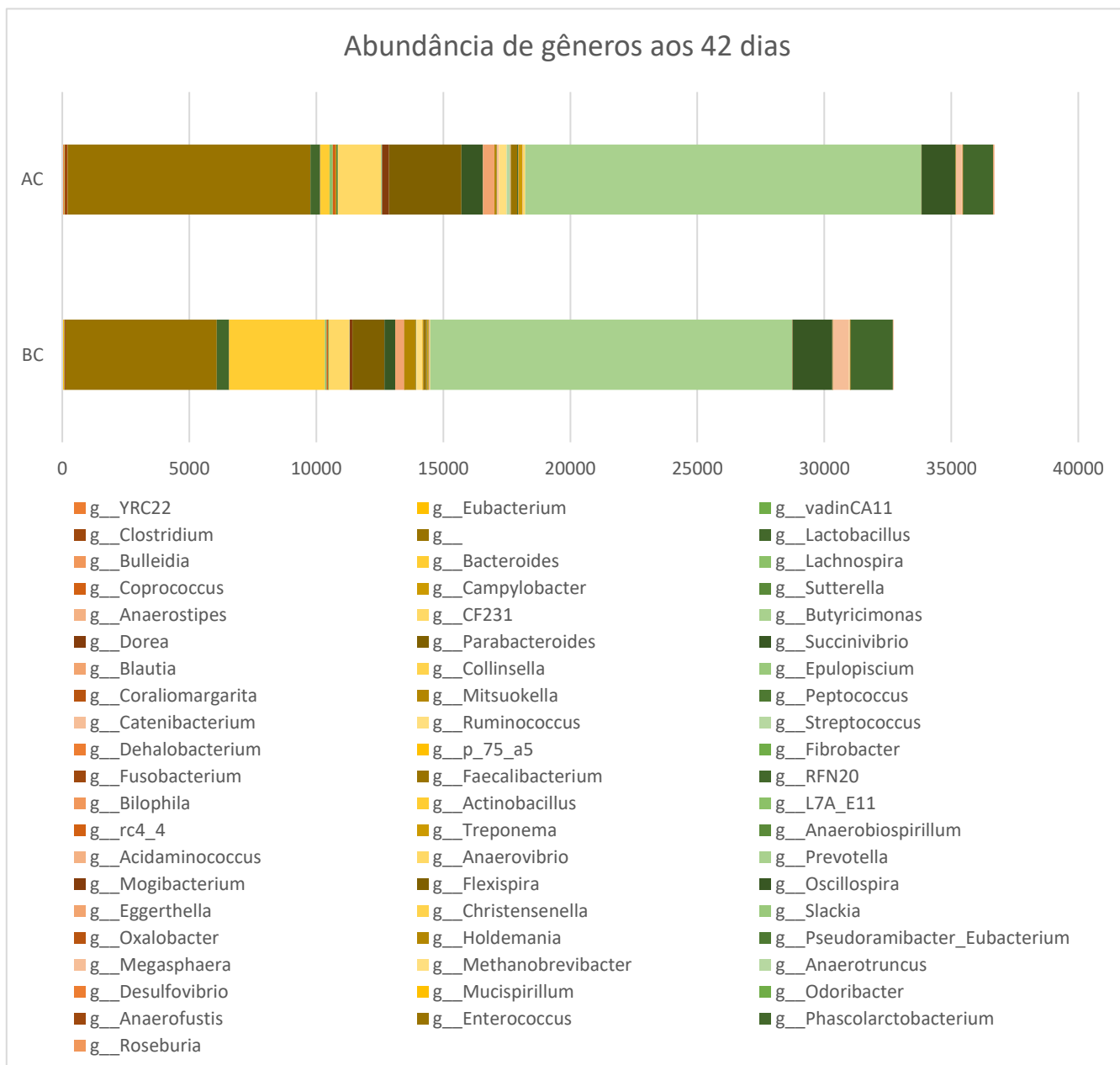


Figura 5. Abundância de gêneros aos 42 dias de idade. Os gêneros mais prevalentes em ambos tratamentos foram Prevotella, Bacteroides, Phascolarctobacterium, Oscillospira, Parabacteroides, Megasphaera, Lactobacillus, Mitsuokella. Houve diferença estatística somente nos gêneros Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Bulleidia, Bacteriodes e Lachnospira. Sendo que no tratamento A os gêneros Eubacterium, Lactobacillus e Bacteriodes foram mais prevalentes nos animais do tratamento BC do que no tratamento AC.

Abundância de gêneros aos 70 dias

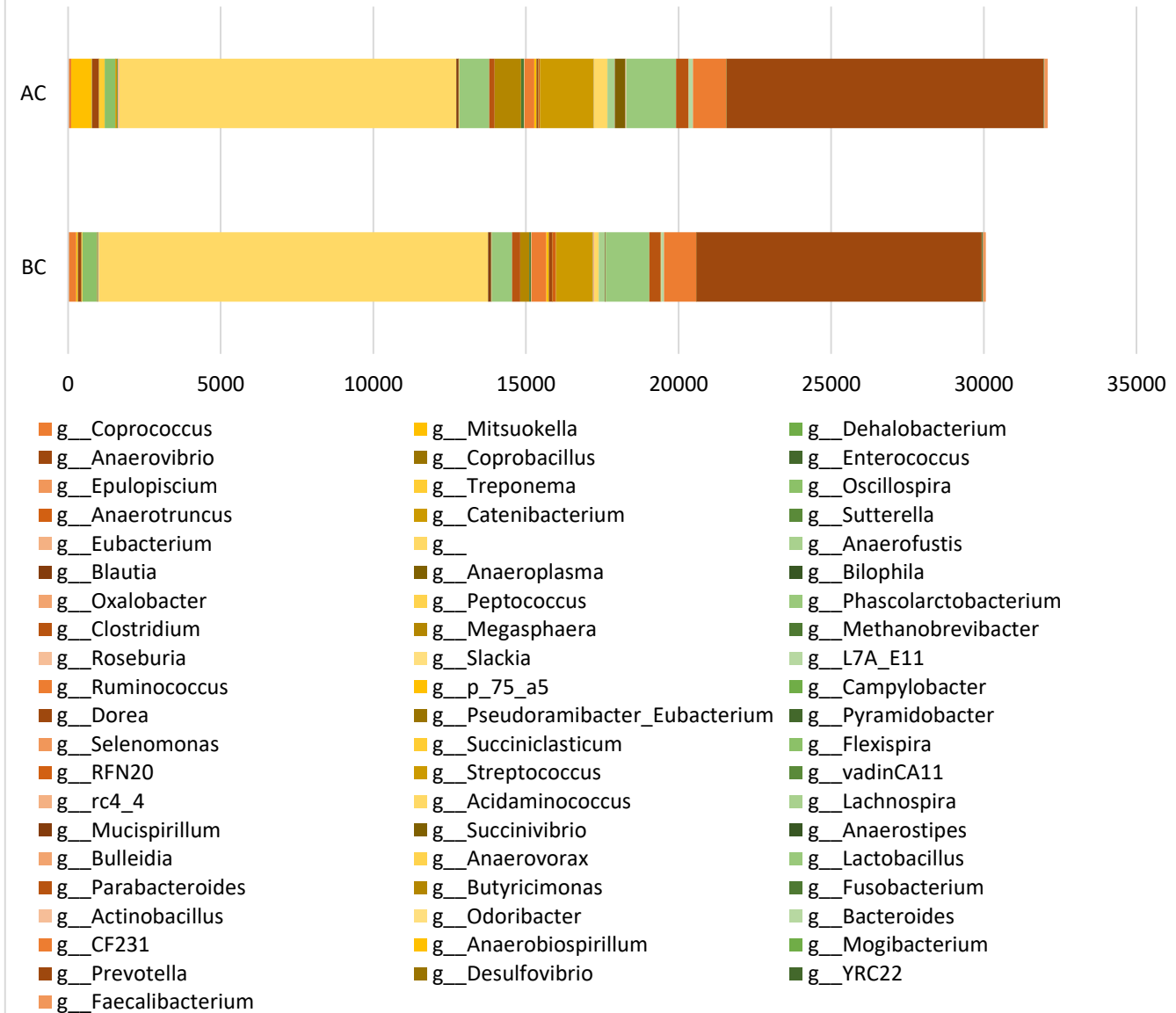


Figura 6. Abundância relativa aos 70 dias de idade. Os gêneros mais prevalentes em ambos tratamentos foram *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Megasphaera*. Os gêneros que se diferiram entre os tratamentos foram *Coprococcus*, *Mitsuokella*, *Dehalobacterium*. Somente o gênero *Mitsuokella* foi mais prevalente no tratamento AC.

6. Discussão

Nas três primeiras semanas de creche, onde há maiores complicações com patógenos entéricos e consumo reduzido (Heo et al., 2013), os dois tratamentos foram equivalentes entre si nos parâmetros avaliados. A queda no desempenho do tratamento SH, observada a partir da fase Inicial 1, pode ser explicada pelo baixo consumo de ração diário acumulado. Isso refletiu em um baixo ganho de peso diário e em um menor peso final. Mesmo consumindo menos, os animais do tratamento SH foram piores na conversão alimentar ao final do experimento.

Apesar do consumo do tratamento CH ter sido maior em relação ao tratamento SH, a melhor conversão alimentar no tratamento CH demonstrou que a eficiência alimentar dos animais tratados com Halquinol foi maior. A modulação da microbiota pelo promotor, provavelmente, foi a causa dos animais do tratamento CH serem mais eficientes, visto que uma microbiota estável melhora a eficiência alimentar de seus hospedeiros, por melhorias no aproveitamento de nutrientes pela fermentação e inibição do crescimento de outros microrganismos potencialmente patogênicos (Williams et al. 2001; Littman e Pamer 2011).

Sabe-se que o consumo pode ser melhorado pela inclusão de antimicrobianos como promotores de crescimento (Gaskins et al., 2002). Ainda, a baixa ingestão de energia gera modificações estruturais no intestino de leitões (Spreeuwenberg et al. 2000). Além disso, a secreção de quimotripsina, tripsina e lipase pelo pâncreas só têm seu desenvolvimento pleno a partir do aumento de consumo voluntário pelos animais (Makkink et al., 1994; Pluske et al., 1997).

Experimentos usando extratos de plantas frente a antimicrobianos como promotores de crescimento tem resultados controversos. Cairo et al. (2018), observaram que, a utilização do extrato de pimenta vermelha em comparação com o uso de Halquinol não induziu diferença no desempenho dos animais dos 21 aos 35 dias de vida, o mesmo comportamento foi observado no presente estudo. Por outro lado, Ahmed et al. (2013) obtiveram resultados piores usando óleos essenciais de plantas quando comparados com melhorador de crescimento.

Apesar do desempenho zootécnico entres os grupos ter sido diferente, o desenvolvimento intestinal dos animais foi o mesmo, ou seja, não houve diferença significativa na morfologia intestinal que justificasse a queda do desempenho do tratamento SH. A introdução de Halquinol a dieta não foi suficiente para alterar de a composição da microbiota a ponto de causar alterações na estrutura do intestino delgado. A microbiota tem um papel importante no desenvolvimento do intestino de leitões desde o nascimento, influenciando em processos desenvolvimento e apoptose de enterócitos, ativando sistema pró-inflamatório e na expressão de diversas proteínas associadas ao metabolismo e a formação de novos enterócitos (Castillo et al., 2006; Danielsen et al., 2007; Rettedal et al., 2009).

O experimento 2 foi conduzido para avaliar o impacto de dietas menos complexas no desempenho e na comunidade microbiana de animais na fase de creche. A dieta do tratamento BC era composta basicamente por milho, soja (farelo e proteína texturizada), derivados lácteos, farinha de peixe e premix vitamínico mineral. Já a dieta do tratamento AC era composta por milho, soja, cereais pré-gelatinizados, farinha de peixe, plasma, ovo e vísceras, derivados lácteos, ácidos orgânicos, leveduras, enzimas, prebióticos e probióticos e óleos essenciais de plantas.

O desempenho dos animais na primeira semana de alojamento foi diferente, sendo que o ganho de peso e peso aos 28 dias foram maiores no grupo tratado com o tratamento AC, reflexo de um consumo maior nos primeiros 7 dias de desmame. A partir dos 42 dias de vida os animais de ambos tratamentos voltaram a ter o desempenho equivalente e ao final do experimento os animais ficaram com o mesmo peso. Desempenho semelhante foi observado por Sikkner et al. (2014),

onde, usando dietas de baixa complexidade e de alta complexidade, o desempenho nas primeiras semanas de alojamento foi pior nos animais alimentados com dietas mais simples.

O consumo do tratamento AC ao longo de todo o experimento foi maior, o que refletiu numa conversão alimentar pior a partir dos 42 dias, com isso acredita-se que a adição de ingredientes que estimulam a ingestão voluntária de alimento foi além do necessário e, dessa forma, houve um consumo de ração que ultrapassou o potencial genético de ganho peso desses animais. Com isso, ao final do experimento, o tratamento BC obteve uma conversão alimentar melhor e com o peso equivalente ao do tratamento AC.

O conteúdo da dieta pode influenciar fortemente a composição da microbiota (Leser et al, 2000). Entretanto, no presente estudo não houve diferença de diversidade nem riqueza entre os tratamentos nos diferentes períodos de coleta, porém dentro de cada tratamento houve diferença de diversidade e riqueza entres os tempos de coleta, demonstrando que a microbiota sofre alterações significativas devido aos componentes da dieta.

A alteração na comunidade microbiana ao longo do tempo foi presente nos dois tratamentos, tanto para riqueza quanto diversidade. Porém, no tratamento B houve maior constância dessa alteração em termos de diversidade o que não aconteceu no tratamento BC. Já a riqueza no tratamento BC sofreu uma queda mais acentuada que no tratamento AC, entre os 21 e 42 dias de vida dos animais.

Sabe-se uma microbiota mais estável é benéfica para o hospedeiro, participando de processos metabólicos e protegendo contra potenciais patógenos (Guevarra et al., 2018). Além disso, a diversidade alfa está relacionada com a saúde intestinal e com o aumento do ganho de peso diário (Lu et al., 2018). Sendo assim, a alteração na comunidade microbiana evidenciada no tratamento BC pode ser uma justificativa para a queda no desempenho dos animais desse grupo, principalmente na primeira semana de alojamento.

O maior número de gêneros que se diferiram entre os tratamentos foi observado na coleta aos 42 dias. Com diferenças em gêneros considerados importantes para os suínos (*Lactobacillus* e *Bacterioides*) com maior prevalência no tratamento BC. O gênero *Bacterioides* é mais comum em animais lactentes devido à sua capacidade de utilizar monossacarídeos e oligossacarídeos presentes no leite de porcas (Pajarillo et al., 2014). Já bactérias do gênero *Lactobacillus* utilizam dissacarídeos como fonte de energia para processos metabólicos, como por exemplo a lactose. Essas bactérias contribuem para a saúde e desenvolvimento intestinal dos animais por acidificarem o meio e por gerarem ácidos graxos de cadeia curta como resultado do processo de fermentação de lactose (Guevarra et al., 2018). Essas diferenças podem ser reflexo dos maiores níveis de lactose nas primeiras rações do tratamento BC.

7. Conclusão

A adição de halquinol melhora o desempenho de leitões de creche em comparação com animais tratados somente com óleos essenciais de plantas, ácidos orgânicos, probióticos e prébióticos. A morfologia intestinal não sofre influência pela a adição de halquinol como promotores de crescimento.

O resultado do segundo experimento demonstrou que é possível reduzir a complexidade de dietas de creche a partir dos 35 dias de vida sem perder o desempenho dos animais. Entretanto, do desmame até os 35 dias de idade, a dieta complexa obteve melhores resultados. Existe interação da complexidade da dieta com a idade dos animais, influenciando a riqueza e a diversidade da comunidade microbiana.

8. Referências

- Ahmed, S. T. et al., 2013. Effects of Resveratrol and Essential Oils on Growth Performance, Immunity, Digestibility and Fecal Microbial Shedding in Challenged Piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Volume 26, pp. 683-690.
- Azain, M. J., 2001. Fat in swine nutrition. Em: A. J. Lewis & L. L. Southern, eds. *Swine Nutrition*. Boca Raton: CRC Press, pp. 95-103.
- Barrow, P. A., Fuller, R. & Newport, M. J., 1977. Changes in the Microflora and Physiology of the Anterior Intestinal Tract of Pigs Weaned at 2 Days, with Special Reference to the Pathogenesis of Diarrhea. *Infection and Immunity*, 18(3), pp. 586-595.
- Bertol, T. M., Filho, J. I. d. S. & Ludke, J. V., 2000. Níveis de Suplementação com Lactose na Dieta de Leitões Desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29(5), pp. 1387-1393.
- Bontempo, V. et al., 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 129, p. 224–236.
- Borgström, B., 1993. Luminal digestion of fats. Em: V. L. W. Go, et al. eds. *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*. New York: Raven Press, p. 475.
- Boudry, G. et al., 2004. Weaning Induces Both Transient and Long-Lasting Modifications of Absorptive, Secretory, and Barrier Properties of Piglet Intestine. *Journal of Nutrition*, Volume 22, pp. 2256-2262.
- Cairo, P. L. G. et al., 2018. 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*, Volume 98, p. 541–548.
- Castillo, M. et al., 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, Volume 114, pp. 165-170.
- Cera, K. R., Mahan, D. C. & Reinhart, G. A., 1988. Weekly digestibilities of diets supplemented with corn oil, lard, or tallow by weanling swine. *Journal of Animal Science*, Volume 66, pp. 1430-1437.
- Cera, K. R., Mahan, D. C. & Reinhart, G. A., 1990. Effect of weaning, week postweaning and diet composition on pancreatic and small intestinal luminal lipase response in young swine. *Journal of Animal Science*, Volume 68, pp. 384-391.
- Chesson, A., 1994. Probiotics and other intestinal mediators. Em: D. J. A. Cole & J. V. M. A. Wiseman, eds. *Principles of Pig Science*. Nottingham: Nottingham University Press, pp. 197-214.
- Chowdhury, S. R. et al., 2007. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics* 2007, 8:215, 8(215), pp. e1471-2164-8-215.
- Corring, T., Aumaitre, A. & Durand, G., 1978. Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. I. Pancreas and pancreatic enzymes. *Nutrition & Metabolism*, Volume 22, pp. 231-243.

- Cranwell, P., 1985. The development of acid and pepsin (EC 3.4.23.1) secretory capacity in the pig; the effects of age and weaning. *British Journal of Nutrition*, Volume 54, pp. 305-320.
- Cromwell, G. L., 2001. Antimicrobial and promicrobial agents. Em: A. J. Lewis & L. L. Southern, eds. *Swine Nutrition*. Boca Raton: CRC Press, pp. 401-426.
- Danielsen, M. et al., 2007. Effects of Bacterial Colonization on the Porcine Intestinal Proteome. *Journal of Proteome Research*, Volume 6, pp. 2596-2604.
- de Lange, C. F. M., Pluske, J., Gong, J. & Nyachoti, C. M., 2010. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*, Volume 134, pp. 124-134.
- de Rodas, B. Z., Maxwell, C. V., Davis, M. E. & Luce, W. G., 1998. Lactose equivalent-80 as a lactose alternative in the diets of phase 2 nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 76(Suppl. 2), p. 63 (Abstr.).
- de Rodas, B. Z., Sohn, K. S., Maxwell, C. V. & Spicer, L. J., 1995. Plasma protein for pigs weaned at 19 to 24 days of age: effect on performance and plasma insulin-like growth factor I, growth hormone, insulin, and glucose concentrations. *Journal of Animal Science*, 73(12), pp. 3657-3665.
- DeRouche, J. M. et al., 2002. Comparison of spray-dried blood meal and blood cells in diets for nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 80(11), pp. 2879-2886.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Meth.*, 10(10), 996–998.
- Edgar, R. C. (2017). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *bioRxiv*, 192211.
- Edmonds, M. S., Izquierdo, O. A. & Baker, D. H., 1985. Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. *Journal of Animal Science*, Volume 60, pp. 462-469.
- Efird, R. C., Armstrong, W. D. & Herman, D. L., 1982. The development of digestive capacity in young pigs: effects of age and weaning system. *Journal of Animal Science*, Volume 55, p. 1380–1387.
- Friesen, K. G. et al., 1993. The effect of pre- and postweaning exposure to soybean meal on growth performance and on the immune response in the early-weaned pig. *Journal of Animal Science*, 71(8), pp. 2089-2098.
- Gallois, M. et al., 2009. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role?. *Animal*, 3(12), p. 1644–1661.
- Gaskins, H. R., Collier, C. T. & Anderson, D. B., 2002. Antibiotics as Growth Promotants: mode of Action. *Animal Biotechnology*, 13(1), pp. 29-42.
- Gatnau, R., Cain, C., Arenston, R. & Zimmerman, D., 1993. Spray-dried porcine plasma (SPPD) as an alternative diet ingredient of weaning pigs. *Pig News and Information*, Volume 14, pp. 157-159.
- Gibson, G. R., 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition*, Volume 129, p. 1438S–1441S.

- Gibson, G. R. et al., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, Volume 17, p. 259–275.
- Giesting, D. W. & Easter, R. A., 1985. Response of starter pigs to supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids. *Journal of Animal Science*, Volume 60, p. 1288–1294.
- Guevarra, R. B. et al., 2018. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(54), pp. 1-9.
- Hall, G. A. & Byrne, T. F., 1989. Effects of age and diet on small intestinal structure and function in gnotobiotic piglets. *Research in Veterinary Science*, Volume 47, pp. 387-392.
- Hampson, D. J., 1986. Alteration in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, Volume 40, pp. 32-40.
- Hao, W.-L. & Lee, Y.-K., 2004. Microflora of the Gastrointestinal Tract. Em: J. F. T. Spencer & A. L. Ragout de Spencer, eds. *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, pp. 491-502.
- Harrison, O. J. & Powrie, F. M., 2013. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), p. a018341.
- Hays, V. W., 1987. Antibiotics in swine production: benefits and concerns. *Feedstuffs*, Volume 4, pp. 13-15.
- Hedemann, M. S. & Jensen, B. B., 2004. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Archives of Animal Nutrition*, Volume 58, p. 47–59.
- Heo, J. M. et al., 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compound. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Volume 97, pp. 207-237.
- Hernández, F. et al., 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, 83(2), pp. 169-174.
- Højberg, O. et al., 2005. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 71, p. 2267–2277.
- Hongtrakul, K. et al., 1996. The effect of carbohydrate source and extrusion processing on growth performance of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 74(Suppl. 1), p. 169(Abstr.).
- Hooper, L. V. et al., 2001. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science*, Volume 291, pp. 881-884.
- Hopwood, D. E. & Hampson, D. J., 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. Em: J. R. Pluske, J. L. Dividich & M. W. A. Verstegen, eds. *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*. Wageningen: The Netherlands: Wageningen Academic, p. 199–217.
- Houdijk, J. G. M., Hartemink, R., Verstegen, M. W. A. & Bosch, M. W., 2002. Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 56(4), pp. 297 - 307.

- Howard, K. A., Forsyth, D. M. & Cline, T. R., 1990. The effect of adaption period to soybean oil additions in the diet of young pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 68, pp. 678-683.
- Huber, S., Gagliani, N. & Flavell, R. A., 2012. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *European Journal of Immunology*, 42(9), pp. 2238-2245.
- Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N. & Ushida, K., 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *Journal of General and Applied Microbiology*, Volume 51, p. 257–265.
- Ivanov, I. I. et al., 2009. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, Volume 139, pp. 485-498.
- Ivanov, I. I. et al., 2008. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host & Microbe*, Volume 4, p. 337–349.
- Jensen, B. B., 2001. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in the gut. Em: A. Piva, K. E. Bach Knudsen & J. E. Lindberg, eds. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham: Nottingham University Press, p. 181–200.
- Jensen, M. S., Jensen, S. K. & Jakobsen, K., 1997. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *Journal of Animal Science*, Volume 75, p. 437 – 445.
- Jensen-Waern, M. et al., 1998. Dietary zinc oxide in weaned pigs-effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. *Research in Veterinary Science*, Volume 64, p. 225–231.
- Jin, C. F. et al., 1998. Effects of various carbohydrate sources on the growth performance and nutrient utilization in pigs weaned at 21 days of age. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, Volume 11, pp. 285-292.
- Jukes, T. H. et al., 1950. Growth promoting effect of aureomycin on pigs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 26, p. 324–330.
- Jukes, T. & Swick, R. A., 1996. Role of growth promotants in poultry and swine feed. *American Soybean Association*, 195(11), pp. 14-24.
- Kamel, C., 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix*, 9(6), pp. 19-24.
- Katouli, M. et al., 1999. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 87, pp. 564-573.
- Kats, L. J. et al., 1994. Effects of spray-dried blood meal on growth performance of the early weaned pig. *Journal of Animal Science*, Volume 72, p. 2860–2869.
- Kerr, C. A. et al., 1998. Evaluation of enzymatically modified potato starches in diets for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 76(11), pp. 2838-2844.
- Kim, I. B. & Allee, G. L., 1997. Effect of carbohydrate source in phase 1 and phase 2 starter diets. *Journal of Animal Science*, 75(Suppl. 1), p. 58 (Abstr.).
- Kim, J. C., Hansen, C. F., Mullan, B. P. & Pluske, J. R., 2012. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 173, pp. 3-16.

- Konstantinov, S. R. et al., 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology*, 8(7), p. 1191–1199.
- Konstantinov, S. R. et al., 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research*, Volume 53, pp. 317-324.
- Kummer, R. et al., 2009. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(Supl1), pp. s195-s209.
- Lalle`s, J.-P., Bosi, P., Smidt, H. & Stokes, C. R., 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, Volume 66, pp. 260-268.
- Lallès, J. P., 1993. Nutritional and antinutritional aspects of soyabean and field pea proteins used in veal calf production: a review. *Livestock Production Science*, 34(1-2), pp. 181-202.
- Lee, C. H. et al., 2000. Study on the nutrition value of dextrin as a carbohydrate source for pigs weaned at 21 days of age. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, Volume 13, pp. 647-663.
- Leser, T. D. et al., 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp. 3290-3296.
- Ley, R. E. et al., 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), pp. 1647-1651.
- Li, D. F., Jiang, J. Y. & Ma, Y. X., 2003. Early weaning diets and feed additives. Em: R. J. Xu & P. Cranwell, eds. *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, p. 247–274.
- Li, D. F. et al., 1991. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early weaned pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 74, pp. 1649-1659.
- Li, D. F. N. J. L. et al., 1990. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *Journal of Animal Science*, Volume 68, pp. 1790-1799.
- Lindemann, M. D. et al., 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *Journal of Animal Science*, Volume 62, pp. 1298-1307.
- Littman, D. R. & Pamer, E. G., 2011. Role of the Commensal Microbiota in Normal and Pathogenic Host Immune Responses. *Cell Host & Microbe*, Volume 10, pp. 311-323.
- Liu, H. et al., 2014. Oral Administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 Favors Intestinal Development and Alters the Intestinal Microbiota in Formula-Fed Piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(2), pp. 860-866.
- Li, X. L. et al., 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *Journal of Nutrition*, Volume 136, pp. 1786-1791.
- Lu, D. et al., 2018. Host contributes to longitudinal diversity of fecal microbiota in swine selected for lean growth. *Microbiome*, 6(4), pp. 1-15.

- Macfarlane, S. & Macfarlane, G. T., 1995. Proteolysis and amino acid fermentation. Em: G. R. Gibson & G. T. Macfarlane, eds. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. Boca Raton: CRC Press, p. 75–100.
- Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(supl), pp. 1035-1045.
- Magurran, A. E., 2004. *Measuring biological diversity*. Malden: Blackwell Science.
- Mahan, D. C., 1991. Efficacy of initial postweaning diet and supplemental coconut oil or soybean oil for weanling swine. *Journal of Animal Science*, Volume 69, pp. 1397-1402.
- Mahan, D. C., Fastinger, N. D. & Peters, J. C., 2004. Effects of diet complexity and dietary lactose levels during three starter phases on postweaning pig performance. *Journal of Animal Science*, Volume 82, p. 2790–2797.
- Mahan, D. C. & Newton, E. A., 1993. Evaluation of feed grains with dried skim milk and added carbohydrate sources on weanling pig performance. *Journal of Animal Science*, 71(12), pp. 3376-3382.
- Makkink, C. A. et al., 1994. Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 72, p. 2843–2850.
- Makkink, C. A., Negulescu, G. P., Guixin, Q. & Verstegen, M. W. A., 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *British Journal of Nutrition*, Volume 72, pp. 353-368.
- Manners, M. J., 1976. The development of digestive function in the pig. *Proceedings of the Nutrition Society*, Volume 35, pp. 49-55.
- Manzanilla, E. G. et al., 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 82, pp. 3210-3218.
- Martinez, V. et al., 2004. Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain. *Peptides*, Volume 25, p. 1733–1744.
- Mellor, S., 2000. Herbs and spices promote health and growth. *Pig Progress*, 16(4), pp. 18-21.
- Metzler, B., Bauer, E. & Mosenthin, R., 2005. Microflora management in the gastrointestinal tract of piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, Volume 18, p. 1353–1362.
- Meurens, F. et al., 2007. Commensal Bacteria and Expression of Two Major Intestinal Chemokines, TECK/CCL25 and MEC/CCL28, and Their Receptors. *PLoS One*, 2(7), p. e677.
- Moeser, A. J. et al., 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Volume 292, p. G173–G181.
- Mowat, A. M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, Volume 3, pp. 331-341.
- Namkung, H. et al., 2004. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, Volume 89, pp. 697-704.

- Nessmith, W. B. J. et al., 1997. Evaluation of the interrelationships among lactose and protein sources in diets for segregated early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 75(12), pp. 3214-3221.
- Oliver, W. T. et al., 2002. Efficacy of partially hydrolyzed corn syrup as a replacement for lactose in manufactured liquid diets for neonatal pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 80, pp. 143-153.
- O'Sullivan, G. C. et al., 2005. Probiotics: An Emerging Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 11(1), pp. 3-10.
- Pajarillo, E. A. B. et al., 2014. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *Journal of General and Applied Microbiology*, 60(4), pp. 140-146.
- Pasternak, A. J., Hamonic, G. M., Van Kessel, A. & Wilson, H. L., 2016. Postnatal regulation of MAMDC4 in the porcine intestinal epithelium is influenced by bacterial colonization. *Physiological Reports*, 4(21), p. e13018.
- Pierce, J. L. et al., 2005. Effect of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 83, p. 2876–2885.
- Pierce, K. M., Callan, J. J., McCarthy, P. & O'Doherty, J. V., 2007. The interaction between lactose level and crude protein concentration on piglet post-weaning performance, nitrogen metabolism, selected faecal microbial populations and faecal volatile fatty acid concentrations. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 132, pp. 267-282.
- Pierzynowski, S. G. et al., 1993. Induction of exocrine pancreas maturation at weaning in young developing pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 16(3), pp. 287-293.
- Piva, A. et al., 2002. Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 80, pp. 670-680.
- Pluske, J. R., Hampson, D. J. & Williams, I. H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, Volume 51, pp. 215-236.
- Pluske, J. R. et al., 2003. Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. *Australian Journal of Agricultural Research*, Volume 54, pp. 515-527.
- Pryde, S. E. et al., 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 217, pp. 133-139.
- Rantanen, M. M. et al., 1995. Influence of oat products on growth performance of weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 73(Suppl. 1), p. 78 (Abstr.).
- Rantzer, D. et al., 1997. Pancreatic Exocrine Secretion During the First Days After Weaning in Pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 75, p. 1324–1331.
- Rettedal, E. et al., 2009. Alteration of the Ileal Microbiota of Weanling Piglets by the Growth-Promoting Antibiotic Chlortetracycline. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), pp. 5489-5495.

- Richert, B. T., Cera, K. R. & Schinkel, A. P., 1996. Effect of dietary carbohydrate source and level on early weaned pig growth performance. *Journal of Animal Science*, 74(Supp. 1), p. 169.
- ROSTAGNO, H. S. et al., 2017. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 4ª ed. Viçosa: Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.
- Sales, J., 2013. Effects of Pharmacological Concentrations of Dietary Zinc Oxide on Growth of Post-weaning Pigs: A Meta-analysis. *Biological Trace Element Research*, Volume 152, p. 343–349.
- Schloss, P. D. et al., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), pp. 7537-7541.
- Servin, A., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 28, pp. 405-440.
- Shirkey, T. W. et al., 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of pro-inflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Experimental Biology and Medicine*, Volume 231, pp. 1333-1345.
- Shroff, K. E., Meslin, K. & Cebra, J. J., 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infection and Immunity*, 63(10), pp. 3904-3913.
- Silveira, H. et al., 2018. Benzoic acid in nursery diets increases the performance from weaning to finishing by reducing diarrhoea and improving the intestinal morphology of piglets inoculated with *Escherichia coli* K88+. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Volume 102, p. 1675–1685.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., Gaskins, H. R. & Mackie, R. I., 2000. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S Ribosomal DNA Amplicons To Monitor Changes in Fecal Bacterial Populations of Weaning Pigs after Introduction of *Lactobacillus reuteri* Strain MM53. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), p. 4705–4714.
- Skinner, L. D. et al., 2014. Impact of nursery feeding program on subsequent growth performance, carcass quality, meat quality, and physical and chemical body composition of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 92, p. 1044–1054.
- Sohn, K. S., Maxwell, C. V., Southern, L. L. & Buchanan, D. S., 72. Improved soybean protein sources for early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, Volume 72, pp. 622-630.
- Spreuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Gaskins, H. R. & Verstegen, M. W. A., 2001. Small Intestine Epithelial Barrier Function Is Compromised in Pigs with Low Feed Intake at Weaning. *Journal of Nutrition*, Volume 131, pp. 1520-1527.
- Stein, H. H. & Kil, D. Y., 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. *Animal Biotechnology*, Volume 17, p. 217–231.
- Stoner, G. R. et al., 1990. Effect of select menhaden fish meal in starter diets for pigs. *Journal of Animal Science*, 68(9), pp. 2729-2735.

- Thacker, P. A., 1999. Nutritional Requirements of Early Weaned Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12(6), pp. 976-987.
- Torsvik, V., Øvreås, L. & Thingstad, T., 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, Volume 296, pp. 1064-1066.
- Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J. & Sarris, K., 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, Volume 70, p. 287-293.
- Tsuboi, K. K. et al., 1985. The nature of maturational decline of intestinal lactase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 840, pp. 69-78.
- Tsuboi, K. K., Kwong, L. K., Neu, J. & Sunshine, P., 1981. A proposed mechanism of normal intestinal lactase decline in the postweaned mammal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 101, pp. 645-652.
- Umesaki, Y. & Setoyama, H., 2000. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes and Infection*, 2(11), pp. 1343-1351.
- Varel, V. H. & Yen, J. T., 1997. Microbial Perspective on Fiber Utilization by Swine. *Journal of Animal Science*, Volume 75, p. 2715-2722.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), p. 5261-5267.
- Warnecke, T. & Gill, R., 2005. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, Volume 4, p. 25.
- Weström, B. R., Ohlsson, B. & Karlson, B. W., 1987. Development of porcine pancreatic hydrolases and their isoenzymes from the fetal period to adulthood. *Pancreas*, Volume 2, pp. 589-596.
- Whitman, W., Coleman, D. & Wiebe, W., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), p. 6578-6583.
- Whittaker, R. H., 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, Volume 30, pp. 279-338.
- Williams, B. A., Verstegen, M. W. A. & Tamminga, S., 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, Volume 14, pp. 207-227.
- Willing, B. P. & Van Kessel, A. G., 2007. Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. *Journal of Animal Science*, Volume 85, p. 3256-3266.
- Willing, B. P. & Van Kessel, A. G., 2009. Intestinal microbiota differentially affect brush border enzyme activity and gene expression in the neonatal gnotobiotic pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Volume 93, p. 586-595.
- Woese, C. R. & Fox, G. E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 74, p. 5088-5090.

Yin, Q. & Zheng, Q., 2005. Isolation and Identification of the Dominant Lactobacillus in Gut and Faeces of Pigs Using Carbohydrate Fermentation and 16S rDNA Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(1), pp. 68-71.

Zimmerman, D. R., 1986. Role of subtherapeutic antimicrobials in animal production. *Journal of Animal Science*, 62(Suppl. 3), p. 6.

9. ANEXO 1. Níveis nutricionais Experimento 1

| | Pré-Inicial 1 | Pré-Inicial 2 | Inicial 1 | Inicial 2 |
|----------------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Proteína Bruta (%) | 21.57 | 21.46 | 21.28 | 19.62 |
| Extrato Etéreo (%) | 5.03 | 4 | 5.92 | 4.93 |
| Fibra Bruta (%) | 1.37 | 1.82 | 2.09 | 2.49 |
| Matéria mineral (%) | 5.88 | 5.91 | 5.62 | 5 |
| Cálcio total (%) | 0.88 | 0.86 | 0.82 | 0.61 |
| Fósforo Total (%) | 0.61 | 0.63 | 0.63 | 0.52 |
| Fósforo Disponível (%) | 0.6 | 0.58 | 0.57 | 0.41 |
| EM Suínos Kcal/kg | 3 518.87 | 3 413.24 | 3 433.60 | 3 338.87 |
| Lisina Dig. Suínos (%) | 1.38 | 1.37 | 1.32 | 1.28 |
| Metionina Dig. Suínos (%) | 0.46 | 0.49 | 0.45 | 0.45 |
| Met + Cis Dig. Suínos (%) | 0.78 | 0.78 | 0.73 | 0.72 |
| Treonina Dig. Suínos (%) | 0.88 | 0.88 | 0.84 | 0.82 |
| Triptofano Dig Suínos (%) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.23 |
| Lactose Total (%) | 15 | 10 | 5 | 0 |
| Sódio (%) | 0.45 | 0.45 | 0.34 | 0.23 |
| Ferro Garantia mg/kg | 100.11 | 100.01 | 100.01 | 95.01 |
| Manganês Garantia mg/kg | 60.09 | 60.03 | 60.03 | 60 |
| Zinco Garantia mg/kg | 2 500.00 | 2 500.00 | 1 800.00 | 140 |
| Cobre Garantia mg/kg | 130 | 130.36 | 200 | 200 |
| Iodo Garantia mg/kg | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.43 |
| Selênio Garantia mg/kg | 0.56 | 0.56 | 0.5 | 0.45 |
| Vitamina A Garantia UI/kg | 11000 | 9900 | 8800 | 7150 |
| Vitamina D3 Garantia UI/kg | 3500 | 3150 | 2800 | 2275 |
| Vitamina E Garantia mg/kg | 50 | 45 | 40 | 32.5 |
| Vitamina K Garantia mg/kg | 6 | 5.4 | 4.8 | 3.9 |
| Tiamina Garantia mg/kg | 5 | 4.5 | 4 | 3.25 |
| Riboflavina Garantia mg/kg | 13 | 11.7 | 10.4 | 8.45 |
| Piridoxina Garantia mg/kg | 70 | 63 | 56 | 45.5 |
| Vitamina B12 Garantia mcg/kg | 40 | 36 | 32 | 26 |
| Niacina Garantia mg/kg | 7 | 6.3 | 5.6 | 4.55 |
| Ácido Pantotênico Garantia mg/kg | 60 | 54 | 48 | 39 |
| Ácido Fólico Garantia mg/kg | 1.4 | 1.26 | 1.12 | 0.91 |

| | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|--------|--------|-------|-------|
| Biotina Garantia mg/kg | 0.4 | 0.36 | 0.32 | 0.26 |
| Colina Garantia g/kg | 0.71 | 0.72 | 0.72 | 0.5 |
| Bacillus subtilis UFC/kg | 624 | 640 | 640 | 640 |
| Bacillus licheniformis UFC/kg | 624 | 640 | 640 | 640 |
| Blend de ácidos Fosfórico/Fumárico/ Butírico mg/kg | 12 825 | 10 900 | 6 300 | 2 000 |
| Blend de óleos essenciais Carvacrol/Timol/Cinamaldeido mg/kg | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 2.02 |

10. ANEXO 2. Níveis nutricionais Experimento 2

Níveis nutricionais dieta de baixa complexidade (BC)

| | Pré-inicial Única | Inicial 1 | Inicial 2 |
|-----------------------------|-------------------|-----------|-----------|
| Proteína Bruta (%) | 21.05 | 22.16 | 22.26 |
| Extrato Etéreo (%) | 6.26 | 4.26 | 4.64 |
| Fibra Bruta (%) | 1.67 | 2.2 | 2.42 |
| Materia Mineral (%) | 6.74 | 7.05 | 5.8 |
| Cálcio total (%) | 0.99 | 0.96 | 0.81 |
| Fósforo Total (%) | 0.7 | 0.74 | 0.57 |
| Fósforo Disponível (%) | 0.52 | 0.5 | 0.32 |
| EM Suínos (Kcal/kg) | 3379.02 | 3193.59 | 3226.07 |
| Lisina Dig. Suínos (%) | 1.39 | 1.43 | 1.38 |
| Met + Cis Dig. Suínos (%) | 0.58 | 0.6 | 0.62 |
| Triptofano Dig Suínos (%) | 0.28 | 0.27 | 0.26 |
| Lactose total (%) | 20 | 8 | 0 |
| Sódio (%) | 0.33 | 0.32 | 0.22 |
| Manganês Garantia (mg/kg) | 34 | 33.9 | 33.31 |
| Zinco Garantia (mg/kg) | 3162.08 | 2139.27 | 110.91 |
| Cobre Garantia (mg/kg) | 22.67 | 85.65 | 80.01 |
| Iodo Garantia (mg/kg) | 0.31 | 0.31 | 0.3 |
| Selênio Garantia (mg/kg) | 0.31 | 0.31 | 0.3 |
| Vitamina A Garantia (UI/g) | 9.07 | 9.04 | 8.82 |
| Vitamina D3 Garantia (UI/g) | 2.27 | 2.26 | 2.21 |
| Vitamina E Garantia (mg/kg) | 68 | 67.79 | 44.37 |
| Vitamina K Garantia (mg/kg) | 4.53 | 4.52 | 4.41 |

| | | | |
|------------------------------------|-------|-------|-------|
| Tiamina Garantia (mg/kg) | ----- | ----- | ----- |
| Riboflavina Garantia (mg/kg) | 8.5 | 8.47 | 8.32 |
| Piridoxina Garantia (mg/kg) | 2.27 | 2.26 | ----- |
| Vitamina B12 Garantia (mcg/kg) | 39.67 | 39.55 | 38.82 |
| Niacina Garantia (mg/kg) | 85 | 84.74 | 83.21 |
| Ácido Pantotênico Garantia (mg/kg) | 28.33 | 28.25 | 27.73 |
| Ácido Fólico Garantia (mg/kg) | 1.7 | 1.69 | ----- |
| Biotina Garantia (mg/kg) | 0.23 | 0.23 | ----- |
| Colina Garantia (g/kg) | 0.55 | 0.55 | ----- |

Níveis nutricionais dieta de alta complexidade (AC)

| | Pré-Inicial 1 | Pré-Inicial 2 | Inicial 1 | Inicial 2 |
|------------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Proteína Bruta (%) | 21.57 | 21.46 | 21.28 | 19.62 |
| Extrato Etéreo (%) | 5.03 | 4 | 5.92 | 4.93 |
| Fibra Bruta (%) | 1.37 | 1.82 | 2.09 | 2.49 |
| Matéria mineral (%) | 5.88 | 5.91 | 5.62 | 5 |
| Cálcio total (%) | 0.88 | 0.86 | 0.82 | 0.61 |
| Fósforo Total (%) | 0.61 | 0.63 | 0.63 | 0.52 |
| Fósforo Disponível (%) | 0.6 | 0.58 | 0.57 | 0.41 |
| EM Suínos Kcal/kg | 3 518.87 | 3 413.24 | 3 433.60 | 3 338.87 |
| Lisina Dig. Suínos (%) | 1.38 | 1.37 | 1.32 | 1.28 |
| Met + Cis Dig. Suínos (%) | 0.78 | 0.78 | 0.73 | 0.72 |
| Triptofano Dig Suínos (%) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.23 |
| Lactose Total (%) | 15 | 10 | 5 | 0 |
| Sódio (%) | 0.45 | 0.45 | 0.34 | 0.23 |
| Ferro Garantia mg/kg | 100.11 | 100.01 | 100.01 | 95.01 |
| Manganês Garantia mg/kg | 60.09 | 60.03 | 60.03 | 60 |
| Zinco Garantia mg/kg | 2 500.00 | 2 500.00 | 1 800.00 | 140 |
| Cobre Garantia mg/kg | 130 | 130.36 | 200 | 200 |
| Iodo Garantia mg/kg | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.43 |
| Selênio Garantia mg/kg | 0.56 | 0.56 | 0.5 | 0.45 |
| Vitamina A Garantia UI/kg | 11000 | 9900 | 8800 | 7150 |
| Vitamina D3 Garantia UI/kg | 3500 | 3150 | 2800 | 2275 |
| Vitamina E Garantia mg/kg | 50 | 45 | 40 | 32.5 |
| Vitamina K Garantia mg/kg | 6 | 5.4 | 4.8 | 3.9 |
| Tiamina Garantia mg/kg | 5 | 4.5 | 4 | 3.25 |
| Riboflavina Garantia mg/kg | 13 | 11.7 | 10.4 | 8.45 |
| Piridoxina Garantia mg/kg | 70 | 63 | 56 | 45.5 |
| Vitamina B12 Garantia mcg/kg | 40 | 36 | 32 | 26 |
| Niacina Garantia mg/kg | 7 | 6.3 | 5.6 | 4.55 |

| | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|--------|--------|-------|-------|
| Ácido Pantotênico Garantia mg/kg | 60 | 54 | 48 | 39 |
| Ácido Fólico Garantia mg/kg | 1.4 | 1.26 | 1.12 | 0.91 |
| Biotina Garantia mg/kg | 0.4 | 0.36 | 0.32 | 0.26 |
| Colina Garantia g/kg | 0.71 | 0.72 | 0.72 | 0.5 |
| Bacillus subtilis UFC/kg | 624 | 640 | 640 | 640 |
| Bacillus licheniformis UFC/kg | 624 | 640 | 640 | 640 |
| Blend de ácidos Fosfórico/Fumárico/ Butírico mg/kg | 12 825 | 10 900 | 6 300 | 2 000 |
| Blend de óleos essenciais Carvacrol/Timol/Cinamaldeido mg/kg | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 2.02 |

11. ANEXO 3. Detalhamento de primers, adaptadores e código de barras desenvolvidos para método fusion de sequenciamento.

| Nome do oligonucleotídeo | Sequência |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| R806_trP1_rev | CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| F515_A_for_BC01 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC02 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC03 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC04 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC05 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC06 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC07 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC08 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGATAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC09 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC10 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC11 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCGAATCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC12 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC13 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC14 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC15 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC16 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC17 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATTCGTCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC18 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| F515_A_for_BC19 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCGGACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC20 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC21 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGCAATTACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC22 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC23 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGCCACGAACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC24 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCTCATTTCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC25 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGAGATACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC26 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTACAACCTCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC27 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCATCCGCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC28 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCCGGAATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC29 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGACCACTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC30 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGGTTATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC31 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCAAGCTGCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC32 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTTACACACGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC33 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTCATTGAACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC34 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGCATCGTTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC35 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGCCATTGTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC36 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGGAATCGTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC37 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGAGAATGTCGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC38 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGAGGACGGACGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC39 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAACAATCGGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC40 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACATAATCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC41 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTTCGCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC42 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACGAATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC43 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGACACCGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC44 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGGCCAGCGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC45 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGAGCTTCTTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC46 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGTCCGAACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC47 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGCAACCACGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC48 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTAAGAGACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |

| | |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| F515_A_for_BC49 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACATAACGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC50 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAATGGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC51 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGAGCCTATTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC52 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCATGGAACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC53 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGGCAATCCTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC54 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGGAGAATCGCGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC55 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCACCTCCTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC56 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGCATTAAATTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC57 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGCAACGGCGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC58 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAACACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC59 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTTATGATGTTTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC60 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC61 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTACTCGGATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC62 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTGCTTACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC63 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTAGAGTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC64 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGAGTTCGACGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC65 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGCACATCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC66 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCAATCATCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC67 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTACCAGTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC68 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAAGAAGTTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC69 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCAATTGGCGATGTGCCAGCMGCCG CGGTAA |
| F515_A_for_BC70 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTACTGGTCGATGTGCCAGCMGCCG CGGTAA |
| F515_A_for_BC71 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGGCTCCGACGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC72 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAAGGCCACACGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC73 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGCCTGTCGATGTGCCAGCMGCCG CGGTAA |
| F515_A_for_BC74 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGATCGGTTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC75 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGGAATACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC76 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGAAGAACCTCGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC77 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAAGCGATTTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC78 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGCCAATTCTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| F515_A_for_BC79 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGGTTGTCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC80 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGAAGGCAGGCGATGTGCCAGCMG CCGCGGTAA |
| F515_A_for_BC81 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGCCATTCGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC82 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGCATCTCGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC83 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAGGACATTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC84 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCATAACGATGTGCCAGCMGCC CGGTAA |
| F515_A_for_BC85 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCAGCCTCAACGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC86 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGTTATTTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC87 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGCTGGACGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC88 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGAACACTTCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC89 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTGAATCTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC90 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAACACGGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC91 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGAAGGATGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC92 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAGGAACCGCGATGTGCCAGCMGC CGCGGTAA |
| F515_A_for_BC93 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGTCCAATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC94 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCGACAAGCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC95 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAGATCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |
| F515_A_for_BC96 | CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAAGCGGTCGATGTGCCAGCMGCC GCGGTAA |

12. ANEXO 4. Principais gêneros comparados entre tratamentos em cada idade

| Gênero | Tratamentos | | P-Value |
|-------------------------|-------------|------|---------|
| | BC | AC | |
| <i>42 dias</i> | | | |
| <i>g__YRC22</i> | 6 | 74 | 0.0032 |
| <i>g__Eubacterium</i> | 69 | 11 | 0.0059 |
| <i>g__vadinCA11</i> | 6 | 14 | 0.0089 |
| <i>g__Clostridium</i> | 49 | 108 | 0.0234 |
| <i>g__</i> | 5951 | 9568 | 0.0274 |
| <i>g__Lactobacillus</i> | 484 | 371 | 0.0274 |
| <i>g__Bulleidia</i> | 5 | 12 | 0.0287 |
| <i>g__Bacteroides</i> | 3775 | 367 | 0.0384 |
| <i>g__Lachnospira</i> | 63 | 121 | 0.0484 |
| <i>g__Coprococcus</i> | 49 | 109 | 0.0601 |

| | | | |
|---------------------------------|-------|-------|--------|
| g__Campylobacter | 8 | 29 | 0.0649 |
| g__Sutterella | 26 | 67 | 0.0745 |
| g__Anaerostipes | 3 | 5 | 0.0962 |
| g__CF231 | 812 | 1689 | 0.1139 |
| g__Butyricimonas | 8 | 44 | 0.1309 |
| g__Dorea | 107 | 273 | 0.1388 |
| g__Parabacteroides | 1260 | 2857 | 0.1388 |
| g__Succinivibrio | 425 | 839 | 0.1928 |
| g__Blautia | 359 | 456 | 0.1937 |
| g__Collinsella | 2 | 1 | 0.1951 |
| g__Epulopiscium | 3 | 3 | 0.1967 |
| g__Coralimargarita | 1 | 1 | 0.1976 |
| g__Mitsuokella | 453 | 88 | 0.2308 |
| g__Peptococcus | 6 | 6 | 0.2411 |
| g__Catenibacterium | 20 | 70 | 0.2468 |
| g__Ruminococcus | 218 | 311 | 0.2766 |
| g__Streptococcus | 6 | 141 | 0.2776 |
| g__Dehalobacterium | 8 | 11 | 0.2806 |
| g__p_75_a5 | 30 | 13 | 0.3011 |
| g__Fibrobacter | 2 | 2 | 0.3458 |
| g__Fusobacterium | 10 | 10 | 0.3523 |
| g__Faecalibacterium | 107 | 242 | 0.3704 |
| g__RFN20 | 23 | 43 | 0.3967 |
| g__Bilophila | 4 | 5 | 0.4002 |
| g__Actinobacillus | 3 | 3 | 0.4094 |
| g__L7A_E11 | 2 | 2 | 0.4094 |
| g__rc4_4 | 2 | 4 | 0.4094 |
| g__Treponema | 59 | 141 | 0.4191 |
| g__Anaerobiospirillum | 4 | 2 | 0.4262 |
| g__Acidaminococcus | 40 | 19 | 0.4332 |
| g__Anaerovibrio | 19 | 92 | 0.4461 |
| g__Prevotella | 14247 | 15599 | 0.4807 |
| g__Mogibacterium | 10 | 10 | 0.4961 |
| g__Flexispira | 19 | 6 | 0.4974 |
| g__Oscillospira | 1559 | 1328 | 0.5414 |
| g__Eggerthella | 1 | 2 | 0.6121 |
| g__Christensenella | 5 | 8 | 0.6466 |
| g__Slackia | 2 | 1 | 0.6494 |
| g__Oxalobacter | 3 | 3 | 0.7200 |
| g__Holdemania | 4 | 3 | 0.7254 |
| g__Pseudoramibacter_Eubacterium | 7 | 7 | 0.7262 |

| | | | |
|--------------------------|-------|-------|--------|
| g__Megasphaera | 627 | 223 | 0.7699 |
| g__Methanobrevibacter | 26 | 13 | 0.7723 |
| g__Anaerotruncus | 6 | 5 | 0.8456 |
| g__Desulfovibrio | 26 | 26 | 0.8579 |
| g__Mucispirillum | 3 | 2 | 0.9316 |
| g__Odoribacter | 9 | 6 | 0.9316 |
| g__Anaerofustis | 2 | 2 | 1.0000 |
| g__Enterococcus | 1 | 4 | 1.0000 |
| g__Phascolarctobacterium | 1658 | 1187 | 1.0000 |
| g__Roseburia | 23 | 40 | 1.0000 |
| <hr/> | | | |
| <i>70 dias</i> | | | |
| g__Coprococcus | 264 | 99 | 0.0030 |
| g__Mitsuokella | 47 | 673 | 0.0251 |
| g__Dehalobacterium | 13 | 10 | 0.0480 |
| g__Anaerovibrio | 108 | 227 | 0.0727 |
| g__Coprobacillus | 2 | 1 | 0.0732 |
| g__Enterococcus | 2 | 1 | 0.0732 |
| g__Epulopiscium | 8 | 3 | 0.0732 |
| g__Treponema | 29 | 183 | 0.0920 |
| g__Oscillospira | 468 | 351 | 0.0924 |
| g__Anaerotruncus | 6 | 5 | 0.1165 |
| g__Catenibacterium | 8 | 51 | 0.1413 |
| g__Sutterella | 33 | 23 | 0.1419 |
| g__Eubacterium | 15 | 49 | 0.1428 |
| g__ | 12761 | 11040 | 0.2198 |
| g__Anaerofustis | 2 | 1 | 0.2320 |
| g__Blautia | 93 | 73 | 0.2324 |
| g__Anaeroplasma | 7 | 1 | 0.2452 |
| g__Bilophila | 3 | 3 | 0.2452 |
| g__Oxalobacter | 8 | 11 | 0.2748 |
| g__Peptococcus | 11 | 15 | 0.2759 |
| g__Phascolarctobacterium | 662 | 976 | 0.3131 |
| g__Clostridium | 262 | 180 | 0.3562 |
| g__Megasphaera | 302 | 860 | 0.3676 |
| g__Methanobrevibacter | 47 | 99 | 0.3852 |
| g__Roseburia | 20 | 10 | 0.4068 |
| g__Slackia | 2 | 2 | 0.4146 |
| g__L7A_E11 | 6 | 3 | 0.4165 |
| g__Ruminococcus | 480 | 322 | 0.4473 |
| g__p_75_a5 | 85 | 70 | 0.4922 |
| g__Campylobacter | 6 | 8 | 0.5101 |

| | | | |
|---------------------------------|------|-------|--------|
| g__Dorea | 96 | 43 | 0.5148 |
| g__Pseudoramibacter_Eubacterium | 4 | 4 | 0.5186 |
| g__Pyramidobacter | 4 | 4 | 0.5186 |
| g__Selenomonas | 1 | 1 | 0.5186 |
| g__Succiniclasticum | 2 | 2 | 0.5186 |
| g__Flexispira | 3 | 3 | 0.5291 |
| g__RFN20 | 116 | 54 | 0.5621 |
| g__Streptococcus | 1210 | 1753 | 0.5621 |
| g__vadinCA11 | 8 | 7 | 0.6137 |
| g__rc4_4 | 32 | 7 | 0.6231 |
| g__Acidaminococcus | 150 | 441 | 0.6353 |
| g__Lachnospira | 200 | 245 | 0.6353 |
| g__Mucispirillum | 4 | 3 | 0.6410 |
| g__Succinivibrio | 6 | 335 | 0.6962 |
| g__Anaerostipes | 9 | 12 | 0.6964 |
| g__Bulleidia | 14 | 18 | 0.7033 |
| g__Anaerovorax | 2 | 2 | 0.7060 |
| g__Lactobacillus | 1429 | 1637 | 0.7127 |
| g__Parabacteroides | 367 | 399 | 0.7127 |
| g__Butyricimonas | 7 | 7 | 0.7527 |
| g__Fusobacterium | 10 | 10 | 0.7609 |
| g__Actinobacillus | 3 | 3 | 0.7768 |
| g__Odoribacter | 5 | 5 | 0.7768 |
| g__Bacteroides | 87 | 123 | 0.7859 |
| g__CF231 | 1054 | 1091 | 0.7924 |
| g__Anaerobiospirillum | 2 | 3 | 0.8733 |
| g__Mogibacterium | 4 | 5 | 0.8733 |
| g__Prevotella | 9342 | 10387 | 0.8748 |
| g__Desulfovibrio | 11 | 12 | 0.9111 |
| g__YRC22 | 32 | 19 | 0.9548 |
| g__Faecalibacterium | 94 | 109 | 0.9577 |
