

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LUCAS DE MARQUES VILELLA

**USO DE TANINOS CONDENSADOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS
DESAFIADOS COM UMA DIETA SIMPLES**

Porto Alegre - RS

Março 2021

LUCAS DE MARQUES VILELLA

**USO DE TANINOS CONDENSADOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS
DESAFIADOS COM UMA DIETA SIMPLES**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, na
Faculdade de Agronomia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Andrea Machado Leal Ribeiro.

Porto Alegre - RS

Março 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Vilella, Lucas de Marques
USO DE TANINOS CONDENSADOS EM SUÍNOS RECÉM
DESMAMADOS DESAFIADOS COM UMA DIETA SIMPLES / Lucas de
Marques Vilella. -- 2021.
87 f.

Orientadora: Andrea Machado Leal Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Digestibilidade. 2. Saúde intestinal. 3.
Microbiota. 4. Metabolismo. 5. Taninos. I. Ribeiro,
Andrea Machado Leal, orient. II. Título.

Lucas de Marques Vilella
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 29.03.21
Pela Banca Examinadora



ANDRÉA MACHADO LEAL RIBEIRO
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientadora

Homologado em: 01/06/2021
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



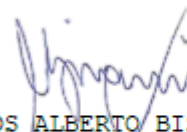
Catarina Stefanello
UFSM



Rodrigo Borille
UFSM



Ines Andretta
UFRGS



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Marise de Marques Vilella e João Carlos Vilella, por terem feito de tudo o possível para que eu tivesse as melhores oportunidades, aos meus irmãos Mateus e Juliana por fazerem parte desta jornada.

Agradeço a minha mulher amada Pâmela Borges Brasil, por ser minha companheira, amiga e colega e por ter me ajudado em todos os momentos difíceis.

A minha orientadora Andrea Machado Leal Ribeiro, por ter me acompanhado e ter feito tudo o possível para me ensinar e conduzir nesta jornada.

Ao laboratório de ensino zootécnico (LEZO) e ao seu grupo por fazerem parte desta jornada e pelas diversas experiências compartilhadas.

A empresa TANAC, pela disponibilidade e auxílio para realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa e a UFRGS pela estrutura e excelência no ensino.

E a todos que de alguma forma ajudaram a chegar nesta conquista.

USO DE TANINOS CONDENSADOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS DESAFIADOS COM UMA DIETA SIMPLES

Autor: Lucas de Marques Vilella

Orientadora: Andrea Machado Leal Ribeiro

RESUMO

Dietas simples oferecem um desafio aos animais principalmente na fase pós desmame, o que pode levar a diversos distúrbios do trato gastrointestinal causados por fatores nutricionais ou pela formação de um ambiente propício ao desenvolvimento de patógenos, podendo ter como resultado a presença de diarreia. Compostos de tanino condensado podem atuar de maneira benéfica nestas circunstâncias. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de um composto de taninos condensados para suínos com 21 dias de idade, recebendo uma dieta simples. Foi avaliado desempenho, digestibilidade aparente do trato total, escore fecal e presença de diarreia, microbioma intestinal e duas citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Foram utilizados 32 leitões, peso médio de $6,3 \pm 0,78$, oito animais por tratamento, assim distribuídos: Controle negativo - dieta basal com 80 ppm de ZnO; Controle Positivo - dieta basal com 2500 ppm de ZnO; Taninos condensados 1 e 2 g/kg de ração – Controle negativo com inclusão de 1 g/kg ou 2 g/kg de composto de taninos condensados. Foram formuladas dietas para as fases pré-inicial (1 a 14 dias pós-desmame) e inicial (15 a 28 dias pós-desmame), com 70 e 35 g/kg de lactose e 360 a 373 g/kg de farelo de soja, respectivamente e sem zinco suplementar. No total foram 28 dias de experimento que finalizou com animais com 49 dias de idade. Foram feitas medidas de peso e de consumo aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós desmame, e sobras de ração foram medidas diariamente. Com estes dados foram obtidas as medidas de desempenho (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar). Entre 7 e 14 e 21 e 28 dias pós desmame foram feitas coleta de fezes e urina para avaliação da digestibilidade aparente do trato total para matéria seca, energia, proteína, retenção de nitrogênio e metabolizabilidade da energia. A ocorrência de diarreia e avaliação do escore fecal foi feita diariamente. Ao final do experimento, quatro animais por tratamento, foram eutanasiados e as seções do trato gastrointestinal foram identificadas e isoladas para evitar trânsito de

conteúdo. Uma amostra de 3 mL do conteúdo cecal foi coletada para análise de microbioma intestinal e um segmento de 5 cm do trato, situado entre o jejuno-íleo para análise de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), ambos armazenados a -80°C. Do conteúdo cecal foi extraído o DNA com o kit ZR fecal DNA MiniPrep da Zymo®, quantificado, amplificado e seqüenciado pelo “MiSeq” Illumina® e posteriormente analisado na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). A análise de citocinas foi feita através de qPCR, utilizando primers específicos para cada alvo. Foram feitas as análises estatísticas no software MiniTab de acordo com cada variável. Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para nenhuma resposta de desempenho nos períodos avaliados. Também não houve diferenças para as respostas de digestibilidade e metabolizabilidade. As fezes produzidas pelos leitões que receberam dietas com taninos apresentaram-se mais úmidas ($p < 0,01$). Os tratamentos não influenciaram maior produção de IL-4 e IL-10 aos 28 dias. No entanto, o tratamento com 2 g/kg de composto de taninos condensados, proporcionou uma maior razão *Firmicutes/Bacteroidetes* o que indica modulação benéfica na microbiota gastrintestinal. O mesmo tratamento mostrou maior incidência dos gêneros *Mitsuokella* e *Acidaminococcus*, que podem ser benéficos ao desempenho. O uso de taninos condensados sobretudo no nível de 2 g/kg de ração apresenta benefícios para os leitões em situação de desafio intestinal.¹

Palavras-chaves: Digestibilidade, Saúde intestinal, Microbiota, Metabolismo.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia-Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (88p.) Março, 2021.

USE OF CONDENSED TANNINS IN WEANED PIGLETS CHALLENGED BY A SIMPLE DIET

Author: Lucas de Marques Vilella

Advisor: Andrea Machado Leal Ribeiro

ABSTRACT

Simple diets offer a challenge to animals especially in the post-weaning phase, which can lead to various disorders of the gastrointestinal tract caused by nutritional factors or the formation of an environment prone to the development of pathogens, that could result in the presence of diarrhea. Condensed tannin compounds can act beneficially in these circumstances. The objective of this study was to evaluate the effect of a compound of condensed tannins for pigs at 21 days of age, receiving a simple diet. Performance, apparent digestibility of the total tract, fecal score and presence of diarrhea, intestinal microbiome and two anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) were evaluated. Thirty-two piglets, initial average weight of 6.3 ± 0.78 , eight animals per treatment, distributed were: Negative control - basal diet with 80 ppm of zinc oxide; Positive Control - basal diet with 2500 ppm of zinc oxide; Condensed Tannins 1 and 2 g/kg of feed - Negative control with inclusion of 1 g/kg or 2 g/kg of condensed tannin compound. Diets were formulated for pre-initial (1 to 14 days post-weaning) and initial phases (15 to 28 days after weaning) with 70 and 35 g/kg of lactose, 360 to 373 g/kg soybean meal, respectively, both with no supplementary zinc level. In total there were 28 days of experiment that ended with 49 days old piglets. Weight and intake measures were taken at 0, 7, 14, 21 and 28 days after weaning, and feed leftovers were measured daily. With these data, performance measures were obtained (feed intake, weight gain and feed conversion). Between 7 to 14 and 21 to 28 days after weaning, feces and urine were collected to assess the apparent digestibility of the total tract for dry matter, energy, protein, nitrogen retention and energy metabolizability. The occurrence of diarrhea and the evaluation of fecal score was taken daily. At the end of the experiment, four animals per treatment were euthanized and sections of the gastrointestinal tract were identified and isolated to avoid transit of content. A sample of 3 mL of cecal content and a 5 cm segment of the tract, located between the jejunum-ileum were collected and stored at -80°C for intestinal microbiome and anti-inflammatory cytokines (IL-4

and IL-10) analysis, respectively. From the cecal content DNA was extracted by Zymo DNA MiniPrep fecal ZR kit®. quantified, amplified and sequenced by "MiSeq" Illumina® and subsequently analyzed on the QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) platform. Cytokine scans were performed using qPCR, using primers specific to each target. Statistical analyses were performed in the MiniTab software according to each variable. No differences were found between treatments for any performance response in the evaluated periods. There were also no differences for digestibility and metabolizability responses. The feces produced by piglets that received diets with tannins were wetter ($P < 0.01$). The treatments did not influence higher production of IL-4 and IL-10 at 28 days. However, the treatment with 2 g/kg of condensed tannin compound provided a higher *Firmicutes/Bacteroidetes ratio*, which indicates beneficial modulation in the gastrointestinal microbiota. The same treatment showed a higher incidence of the genera *Mitsuokella* and *Acidaminococcus*, which may be beneficial to performance. The use of condensed tannins mainly at the level of 2 g/kg of feed has benefits for piglets in a challenging intestinal media.²

Key words: Digestibility, Intestinal health, Metabolism, Microbiote.

² Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (88p.) March, 2021.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de um tanino hidrolisável.....	26
Figura 2. Estrutura química de um tanino condensado.	27
Figura 3. Expressão relativa de IL-10 em relação ao grupo referência (GAPDH). ...	65
Figura 4. Expressão relativa de IL-4 em relação ao grupo referência (GAPDH).	66
Figura 5. A análise de componente principal (PCA) obtida com os dados de filo (acima) e família (abaixo).	67
Figura 6. Heatmap. Abundância dos principais filos bacterianos e de Archaea presentes nas amostras analisadas.	68
Figura 7. Distribuição das proporções do filo Bacteroidetes nos diferentes grupos.	69
Figura 8. Distribuição das proporções do filo Firmicutes nos diferentes grupos.	70
Figura 9. Distribuição das proporções do gênero Mitsuokella nos diferentes grupos.	71
Figura 10. Distribuição das proporções do gênero Acidaminococcus nos diferentes grupos.	72
Figura 11. Distribuição das proporções do gênero Parabacteroides nos diferentes grupos.	73

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Composition and nutritional levels of the experimental control diets (g/kg).	60
TABELA 2 – Average body weight (BW kg), average feed intake (AFI g day ⁻¹), average weight gain (WG g day ⁻¹) and feed conversion ratio (FCR: feed intake/weight gain) of piglets in the pre-starter period (1-14 days), initial period (15-28 days) and total period (1-28 days) receiving condensed tannins compost (CTC) or supplemented ZnO.	61
TABELA 3 – Apparent total tract digestibility (ATTD) of dry matter (DM), gross energy (GE), crude protein (CP) and coefficient of nitrogen retention (NR) and metabolisability of gross energy (MGE) of the pre-initial and initial diets.....	62
TABELA 4 - Average fecal score ¹ in the pre-initial period (1 to 14 days), initial (15 to 28 days) and total (1 to 28 days) of piglets receiving condensed tannins compost (CTC) or supplemented ZnO.....	63
TABELA 5 – Firmicutes/Bacteroidetes rate in the cecal content of piglets receiving condensed tannins compost (CTC) or supplemented ZnO.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
CDATT	Coeficiente de Digestibilidade Aparente do Trato Total
CTC	Composto de taninos condensados
EB	Energia bruta
EFSA	European Food Security Authority
kg	Quilogramas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEB	Metabolizibilidade da Energia Bruta
mg	Miligramas
MS	Matéria Seca
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	partes por milhão
PB	Proteína Bruta
RN	Retenção de Nitrogênio
TC	Taninos Condensados
TH	Taninos Hidrolisáveis
TGI	Trato Gastrointestinal
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. EFEITOS DO DESMAME SOBRE OS LEITÕES.....	17
2.2. IMPORTÂNCIA DO MICROBIOMA.....	19
2.2.1. Aspectos relacionados à microbiota intestinal.....	19
2.2.2. Função protetora.....	20
2.2.3. Metagenômica.....	21
2.3. RESPOSTAS IMUNE E SAÚDE INTESTINAL DOS SUINOS RECÉM- DESMAMADOS.....	22
2.3.1. Respostas inflamatórias.....	22
2.4. USO DE ADITIVOS ANTIMICROBIANOS.....	23
2.5. ADITIVOS FITOGÊNICOS.....	24
2.6. TANINOS.....	25
2.6.1. Taninos Hidrolisáveis (TH).....	25
2.6.2. Taninos Condensados (TC).....	26
2.7. Efeito do uso de taninos na alimentação animal.....	28
2.8. ZINCO COMO ADITIVO ANTIMICROBIANO.....	29
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO II.....	33
USE OF CONDENSED TANNINS IN WEANED PIGLETS CHALLENGED BY A SIMPLE DIET.....	35
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
<i>Animais, instalações e tratamentos.....</i>	39
<i>Desempenho e digestibilidade.....</i>	40
<i>Escore de consistência fecal.....</i>	42
<i>Microbioma e expressão gênica de IL – 4 e IL-10.....</i>	42
<i>Análise estatística e delineamento experimental.....</i>	44
RESULTADOS.....	45
<i>Desempenho zootécnico e digestibilidade aparente do trato total e escore fecal.....</i>	45
<i>Citocinas.....</i>	45
<i>Microbioma.....</i>	45
DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO.....	52

AGRADECIMENTOS	53
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO III	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
VITA	87

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Devido ao risco de resistência antimicrobiana (Gresse et al., 2019) o uso de aditivos antimicrobianos na alimentação animal tem sido cada vez mais restrito. Portanto, têm surgido medidas quanto ao uso prudente de antimicrobianos e pela busca de novas soluções para prevenir e tratar infecções (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2017). Aditivos baseados em níveis farmacológicos de zinco e cobre em níveis que variam entre 2000 a 3000 ppm, também são utilizados na fase pós-desmame. Porém, é recomendada a diminuição do uso desses minerais devido à suspeita de resistência bacteriana e o impacto destes metais no meio ambiente (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar - EFSA, 2017; OMS, 2017).

A busca por alternativas tem demonstrado que os extratos vegetais possuem diversas capacidades antibióticas e imunoestimulantes e capazes de reduzir o estresse dos animais (Costa et al., 2007). Os taninos, são compostos de polifenóis provenientes do metabolismo secundário das plantas. Dividem-se em dois grupos: taninos hidrolisáveis, constituídos de fenóis simples, e taninos condensados, também denominados proantocianidinas, formados por oligômeros e polímeros de flavonoides. São os de maior abundância na natureza (Battestin et al., 2004) e possuem a capacidade de formar ligações com proteínas, podendo ligar-se à celulose e pectina para formar complexos insolúveis. Além disso, precipitam alcaloides e gelatinas e interagem com polissacarídeos e enzimas envolvidas na digestão de proteínas e carboidratos (Battestin et al., 2004).

Devido a estas características, os taninos são conhecidos por possuírem propriedades antinutricionais, principalmente na alimentação de animais não ruminantes. No entanto, estas mesmas propriedades fazem deles compostos com efeitos antibacterianos, antivirais e antidiarreicos (Min et al., 2007, Wang et al., 2009). Vários estudos têm demonstrado que a utilização de alimentação suplementada com baixas concentrações, entre 1 e 2 g/kg de alimento, de taninos promove a saúde animal, a melhora no estado nutricional e o desempenho zootécnico de leitões desmamados, suínos em crescimento e frangos de corte (Biagia et al., 2010; Brus et al., 2013; Starcevic et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de dois níveis suplementares de um composto de taninos condensados de 1 g/kg e 2 g/kg de

ração, na alimentação de suínos recebendo dietas simples e seus efeitos sobre desempenho, digestibilidade aparente do trato total, ocorrência de diarreia, composição do microbioma e citocinas anti-inflamatórias em leitões com até 49 dias de idade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EFEITOS DO DESMAME SOBRE OS LEITÕES

O desmame é um grande desafio aos leitões. A soma de fatores estressores como à perda de contato com a porca, alteração da dieta líquida para uma dieta sólida, mudança de ambiente, tensão social causada pelo contato com outros grupos, aumenta o desafio imunológico, tornando este um período crítico para o desempenho dos animais deixando-os mais susceptíveis a enfermidades (Kummer et al. 2009; Mellor, 2000; Viola & Vieira, 2003).

Por mais digestíveis, complexas e concentradas que sejam as dietas, é comum que alguns leitões recém-desmamados não consigam suprir suas exigências, pois seu consumo de ração é muito baixo. Soma-se a isso a imaturidade do sistema digestório, limitando a capacidade de ingestão devido a capacidade física, e a secreção insuficiente de ácido clorídrico e de enzimas digestivas, o que não permite uma digestão e absorção de nutrientes adequada (De Lima et al., 2009; Molly, 2001).

A ingestão insuficiente de alimento, a digestão incompleta e, na maioria dos casos, a presença de farelo de soja nas dietas secas que causa reações alergênicas e além de afetar o pH deixando o ambiente menos ácido, desta forma levam a alterações nas estruturas do epitélio intestinal (Pluske, 2001). Um dos efeitos é o encurtamento das vilosidades e aprofundamento das criptas que, desta forma, passam a apresentar um menor número de células absorptivas e um maior número de células secretoras (Hedemann et al., 2003; Pluske, 2001). Além da redução da absorção de carboidratos e aminoácidos, há uma queda na absorção de líquidos, e de minerais como o sódio, o potássio e o cloreto, podendo levar o animal a uma diarreia. Ainda, a digestão incompleta dos carboidratos e proteínas, propicia um substrato para o desenvolvimento de potenciais patógenos, o que pode levar a um processo de fermentação, produzindo toxinas e gerando aumento no processo

inflamatório, bem como, causando danos ao epitélio, que podem levar a morte do animal (De Lima et al., 2009; Molly, 2001).

2.1.1 DIETAS COMPLEXAS E DIETA SIMPLES

A elaboração de dietas para a alimentação dos leitões na fase pós desmame tem de levar em consideração todos os fatores relacionados à fisiologia destes animais. Desta forma, dietas empregadas neste período são consideradas dietas de alta complexidade para garantir uma alta digestibilidade.

O desmame leva à substituição de uma dieta líquida para uma dieta sólida que modifica a forma de consumo e a composição. Logo, são dietas formuladas visando complementar a fisiologia dos animais a fim de diminuir os custos do desafio causado pela modificação da dieta. As principais fontes de energia no leite materno são a gordura e a lactose que serão substituídos por amido e óleo vegetal; a caseína altamente digestível será substituída por proteínas vegetais menos digestíveis. Estes ingredientes podem apresentar antígenos que causam reações de hipersensibilidade transitória, uma vez que o leitão fica sem a proteção imunológica do leite materno (Kummer et al., 2009).

O sistema digestivo imaturo de leitões apresenta uma secreção insuficiente de enzimas digestivas e a inadequada produção de ácido clorídrico (De Lima et al., 2009). Estes fatores levam à diminuição de consumo, menor digestibilidade dos nutrientes o que leva a distúrbios entéricos causados pela proliferação de bactérias, vírus, parasitos ou desequilíbrios nutricionais que causam diarreias, inflamação do TGI, diminuição dos processos de absorção e secreção das células do epitélio do TGI.

A maioria das dietas formuladas para esta fase levam em consideração a digestibilidade (Pupa & Rostagno, 1998), a capacidade tamponante e a antigenicidade dos ingredientes (Branco et al., 2006). Portanto, contêm ingredientes como soro de leite, plasma suíno, fontes de amido de maior digestibilidade, fontes proteicas como farelo de peixe e soja na forma texturizada, extrusada ou como proteína isolada ou concentrado proteico, além de aminoácidos e enzimas.

No entanto estas dietas são caras representando um grande custo na produção, além de serem complicadas de produzir na propriedade. Dietas simples, são em sua maioria dietas compostas por farelo de soja e milho e são economicamente mais baratas. No entanto o milho e o farelo de soja apresentam

estruturas complexas como polissacarídeos não amiláceos (PNA) que limitam o aproveitamento dos nutrientes (Huisman & Tolman, 1992), além de fatores alergênicos como as frações proteicas, glicina e beta-conglicina, que provocam reação de hipersensibilidade no leitão, comprometendo a mucosa intestinal e, conseqüentemente, o desempenho (Kummer et al., 2009). O uso de enzimas agalactosidase, Beta-glucanase e xilanase diminuem estes efeitos, além de favorecer beneficemente a morfologia intestinal, provavelmente pela atuação das enzimas sobre os fatores alergênicos (Pascoal et al., 2008). Mori et al. (2007) verificaram que a adição de complexo enzimático neste tipo de dietas influenciou a morfologia intestinal, aumentando a capacidade de absorção dos nutrientes.

2.2. IMPORTÂNCIA DO MICROBIOMA

2.2.1. Aspectos relacionados à microbiota intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é o maior compartimento dos suínos e está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo digestão, absorção, metabolismo de nutrientes, desenvolvimento imunológico e proteção contra patógenos (Clemente et al., 2012). O TGI abriga uma diversificada população de microrganismos não patogênicos, incluindo, fungos, bactérias e arqueas que mantêm uma complexa interação com o hospedeiro, denominada microbiota comensal (Issacson & Kim, 2012). Esta interação é proveniente de uma coevolução resultante da simbiose entre as partes (Ley et al., 2008).

As principais funções da microbiota intestinal para seu hospedeiro incluem atividades metabólicas, que resultam no melhor aproveitamento de energia e nutrientes absorvíveis, maturação do epitélio intestinal e do sistema imune e, ainda, conferem proteção ao hospedeiro contra a colonização de microrganismos patogênicos. Todas essas funções auxiliam no equilíbrio da homeostase do hospedeiro (Guarner & Malagelada, 2003).

Além de auxiliar no melhor aproveitamento da dieta, as bactérias são conhecidas por fornecer metabólitos. Determinados gêneros e espécies são capazes de estimular o transporte de sais e água, auxiliam na absorção de cálcio, magnésio e ferro, aumentam a absorção e produção de fosfatase alcalina exógena, melhoram a capacidade de reutilização de sais biliares, sintetizam compostos importantes como

a vitamina K, e melhoram o padrão de resposta para insulina (Gresse et al., 2019; Ley et al., 2008; Ramayo-Caldas 2016; Sekirov et al., 2010).

2.2.2. Função protetora

A microbiota desempenha um papel fundamental na saúde e crescimento dos animais, diminuindo doenças inflamatórias, imunes e infecciosas (Mulder et al., 2009). Esta interação entre a microbiota e a mucosa do TGI, principalmente nos animais jovens, tem uma importante função na suscetibilidade do hospedeiro e no desencadeamento de respostas (Celi et al., 2017).

Além da interação e modulação da resposta imune, a microbiota comensal age de forma direta no controle de microrganismos patogênicos, uma vez que, por meio da inibição competitiva, controlam a colonização dos sítios por microrganismos exógenos (Sommer, 2017). O sistema imune do TGI é regulado por meio de vários mecanismos moleculares, para evitar a ativação excessiva de fatores que acarretem excesso de líquido e a inflamação em resposta a esses fatores externos e internos. Assim, numerosos tipos de células, como as dendríticas, linfócitos (sistema imune adaptativo), macrófagos e citocinas (sistema imune inato), desenvolveram a capacidade de comunicação entre o microbioma do TGI e o sistema imune mucoso (Molly 2001; Mulder et al., 2009).

A composição microbiana é representada principalmente por cinco principais filos (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Spirochaetes*), independentemente da idade. As bactérias do filo *Firmicutes* representam a maior proporção da população total, seguido de *Bacteroidetes*. Estes dois filos correspondem por aproximadamente 90% de todas as bactérias presentes (Kim et al., 2011; Looft et al., 2012).

Ao longo do desenvolvimento dos animais, a microbiota é alterada até o estabelecimento de uma população estável (Kim et al., 2011). Dentre os fatores que podem influenciar na composição da microbiota, podemos destacar a idade, a linhagem, a localização no TGI, o uso de antimicrobianos, aditivos e probióticos, o tipo de dieta fornecida e o estado de saúde dos animais (Borewicz et al., 2015; Kim et al., 2011; Leser et al., 2000; Ley et al., 2008; Looft et al., 2014; Pajarillo et al., 2014; Roca et al., 2014).

Podemos observar que a diversidade microbiana aumenta significativamente nos segmentos gastrointestinais mais distais em relação às porções proximais (Roca, et al., 2014). Vários fatores, tais como pH mais neutro, baixo trânsito intestinal e ambiente anaeróbio estão associados com o aumento da sobrevivência das bactérias no intestino grosso.

Um estudo piloto para explorar as diferenças na composição do microbioma em porções do jejuno, íleo, ceco e cólon foi realizada por Isaacson et al. (2012). Estes autores comprovaram que as composições da microbiota do cólon e do ceco foram muito semelhantes, representadas pelos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Contudo, as composições da microbiota do jejuno e íleo foram bastante diferentes. No jejuno, bactérias do filo *Firmicutes* representaram mais de 90% da microbiota, seguido por bactérias dos filos *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e *Actinobacteria*. No íleo, *Firmicutes* e *Proteobacteria* foram os dois filos dominantes.

2.2.3. Metagenômica

A comparação de comunidades microbianas é feita principalmente pela amplificação e análise do gene rRNA16S, na qual permite avaliar toda a microbiota envolvendo bactérias e arqueas presente em uma amostra (Ley et al., 2008). Dessa forma, a metagenômica tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada para estudar a ecologia e evolução das comunidades bacterianas e já demonstrou ser mais sensível na detecção de espécies de bactérias em menor concentração do que os métodos dependentes da cultura ou sequenciamento da região do gene rRNA 16S (Lamendella et al., 2011).

Ao utilizar o sequenciamento do gene 16S rRNA, houve um aumento substancial do volume de dados, verificação da composição das comunidades microbianas e a observação da diversidade dos mesmos (Ley et al., 2008). O rRNA 16S é um dos genes conservados em arqueas e bactérias com regiões variáveis que permitem a determinação das espécies (Woese & Fox, 1977). Através do sequenciamento genômico, foi possível uma melhor exploração das informações quanto à composição, a distribuição da microbiota, a diversidade e as suas funções relacionadas ao hospedeiro (Isaacson & Kim, 2012).

2.3. RESPOSTAS IMUNE E SAÚDE INTESTINAL DOS SUINOS RECÉM-DESMAMADOS

O sistema imunológico é responsável por detectar a presença de um antígeno, sendo ele uma substância química ou um ser estranho ao organismo (bactérias, vírus, proteínas etc.) e transmitir a informação ao resto do corpo para que esse possa responder com alterações metabólicas e comportamentais, que afetem o desempenho e a exigência em nutrientes. Em geral, o sistema imune reage aos antígenos, liberando citocinas que ativam os componentes celulares (fagócitos) e humorais (anticorpos), tendo como consequência a queda no consumo de alimentos, a elevação da temperatura corporal e a produção de calor (Kummer et al., 2009).

Essa ativação do sistema imunológico leva à modificação na repartição dos nutrientes, principalmente energia e proteína, pelo aumento da taxa metabólica basal, com maior utilização de carboidratos. Dessa maneira, parte da glicose conseguida através dos alimentos segue seu curso normal para os tecidos periféricos, ao passo que a outra parte é utilizada para ativação do sistema imunológico. Assim, a necessidade de energia fica aumentada (Klasing, 1998).

Outra consequência prejudicial da ativação do sistema imunológico é a redução da síntese proteica, associada a maior taxa de degradação. A necessidade de nitrogênio aumenta também para síntese de proteínas de fase aguda e de outros produtos imunológicos. De acordo com Shurson & Johnston (1998), ocorre ainda maior deaminação de aminoácidos e maior excreção de nitrogênio urinário.

2.3.1. Respostas inflamatórias

O processo inflamatório ocorre como resposta à injúria celular tecidual e esse processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos, tais como o extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, lise tecidual e reparo (Carvalho & Lemônica, 2020). Em consequência da lesão aguda da mucosa intestinal, ocorrem três eventos locais que resultam na restauração da continuidade epitelial e da permeabilidade normal (Blikslager et al., 2007):

- a) a contração dos vilos para promover a redução da área superficial exposta;

- b) a migração de células epiteliais para reparar a membrana basal exposta;
- c) o fechamento dos espaços existentes entre as células epiteliais, que irão ficar mais próximas.

A ativação do sistema imune gastrointestinal gera a produção de diversas células especializadas e moléculas sinalizadoras que possuem importante papel na regulação das respostas imunes e inflamatórias. Os processos inflamatórios são regulados pelas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α) e demais componentes imunológicos. Esta resposta leva a diminuição do consumo de alimento e elevação da temperatura corporal. No entanto, em resposta, ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e IgE) que inibem este processo. As interleucinas IL-4 e IL-10 tem importante função de inibir a síntese de outras citocinas. A IL-4 também atua na construção da resposta imune Th2 (resposta humoral) enquanto a IL-10 inibe a resposta Th1 (resposta citotóxica) (Abbas et al., 2014; Omanakuttan et al., 2020).

2.4. USO DE ADITIVOS ANTIMICROBIANOS

Na produção animal são utilizados vários antimicrobianos, constituindo-se no setor que lidera mundialmente o consumo desses produtos (Costa et al., 2007). Os antimicrobianos são amplamente utilizados e funcionam no controle da microbiota intestinal, fazendo com que ocorra maior desempenho zootécnico dos animais no sistema de produção de suínos. No entanto, quando ocorre o uso em excesso pode haver um aumento da resistência antimicrobiana (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

Diante destes fatos, os consumidores têm exigido a restrição ao uso destes aditivos, e esta pressão tem aumentado a busca por alternativas que garantam o desempenho produtivo sem interferir na qualidade do produto (Oetting et al., 2006) e garantam a saúde animal e humana (Gresse et al., 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou normas que delimitam o uso de antimicrobianos de forma consciente (OMS, 2017). No Brasil, vários antimicrobianos já foram suspensos da produção animal e a Instrução Normativa nº 03 de janeiro de 2020 (Brasil, 2020) passou a restringir ainda mais os antimicrobianos como aditivo zootécnico adicionado às rações animais.

Diante da importância deste setor para o agronegócio brasileiro, e diante da proibição dos antimicrobianos melhoradores de desempenho, uma lacuna científica se forma, fazendo-se necessários estudos de produtos alternativos aos antibióticos melhoradores de desempenho. Entre esses produtos alternativos podemos destacar os aditivos fitogênicos e os ácidos orgânicos.

Os aditivos antimicrobianos de origem natural agem como melhoradores de desempenho de animais criados de forma intensiva, auxiliando na manutenção da saúde intestinal, permitindo maior ganho de peso diário e melhorando a conversão alimentar destes animais (Costa et al., 2007). Estes aditivos vêm sendo testados nas dietas de suínos como potenciais alternativas aos antibióticos e quimioterápicos convencionalmente usados como melhoradores de desempenho (Kim et al., 2012). A melhora no desempenho de animais de produção que recebem aditivos alimentares pode ocorrer devido ao aumento na digestibilidade e absorção de nutrientes, estímulo da secreção de enzimas digestivas (Costa et al., 2007), pela melhora na saúde intestinal por meio da manutenção da microbiota benéfica e pelos efeitos benéficos no epitélio intestinal (Claus et al., 2007), além de outros efeitos inerentes a cada aditivo.

2.5. ADITIVOS FITOGÊNICOS

Os aditivos fitogênicos são definidos como compostos derivados de plantas, que são incorporados às dietas animais com a finalidade de promover melhor desempenho e melhor qualidade dos produtos obtidos destes animais. Estes, classificam-se de acordo com a sua origem e processamento em: extratos, condimentos, óleos essenciais (compostos lipofílicos extraídos por vaporização ou destilação a álcool) e oleoresinas (compostos extraídos por solventes não aquosos) (Windisch et al., 2008).

Os extratos vegetais são ricos em princípios ativos, sendo que estes variam muito em concentração e em atividade antibacteriana, de acordo com a espécie botânica e parte da planta que são extraídas (Cheng et al., 2014; Costa et al., 2008). Esses compostos são conhecidos por seus efeitos anti-inflamatório, antiviral (Costa et al., 2007), antioxidante, antiparasitário, coccidiostático e efeito imunomodulador, sendo que suas propriedades multifuncionais dependem dos compostos bioativos presentes em cada extrato (Cheng et al., 2014).

2.6. TANINOS

Os taninos são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e, definidos como polímeros solúveis em água e solventes polares, que formam ligações com proteínas. Combinam-se à celulose e pectina para formar complexos insolúveis e precipitam alcalóides e gelatinas, interagem com outras macromoléculas como os polissacarídeos e enzimas envolvidas na digestão das proteínas e carboidratos (Battestin et al., 2004)

Nas plantas, os taninos encontram-se em raízes, lenho, casca, folhas, frutos, sementes e na seiva, sendo que o conteúdo e composição variam (Battestin et al., 2004). Quando extraídos, os taninos podem apresentar-se como um pó amorfo com coloração variando do amarelo claro ao marrom, apresentando sabor adstringente (Khanbabaee & Ree, 2001).

Os taninos formam o complexo tanino-carboidrato, que reduz a atividade das enzimas amilolíticas, ocasionando diminuição da digestão dos carboidratos e, conseqüentemente, do seu aproveitamento energético (Fialho & Barbosa, 1992). Essa ligação aumenta quando os carboidratos apresentam alto peso molecular (polissacarídeos), baixa solubilidade e conformação flexível (Fialho & Barbosa, 1992). Além disso, proteínas com alto peso molecular e estruturas abertas e flexíveis associam-se mais fortemente aos taninos; a afinidade das proteínas aos taninos é maior no ponto isoelétrico da proteína, podendo haver variações quanto ao pH (Frutos et al., 2004). A classificação mais usual dos taninos tem como base a estrutura molecular e os divide em taninos hidrolisáveis (TH) e taninos condensados (TC) (Battestin et al., 2004).

2.6.1. Taninos Hidrolisáveis (TH)

Estes taninos são definidos como poliésteres de ácidos fenólicos, apresentam no centro da molécula um carboidrato poliálcool geralmente D-glucose (Figura 1) na sua estrutura e não são muito abundantes na natureza (Müeller-Harvey & McAllan, 1992). Os grupos hidroxila dos carboidratos encontram-se parcial ou totalmente esterificados com grupos fenólicos, como o ácido gálico (nos galotaninos) ou o ácido elágico (nos elagitaninos). Os TH por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar (Sgarbieri, 1996). Este tipo de taninos é abundante em

folhas, frutas, e vagens de dicotiledôneas, mas não tem sido detectado em monocotiledôneas (Lewis & Yamamoto, 1989), e pode sofrer facilmente hidrólise por bases, ácidos e esterases. A hidrólise do ácido tânico, um típico tanino hidrolisável, pode acontecer espontaneamente ou pela ação de enzimas, e tem como resultado a glicose e o ácido gálico. (Singleton & Kratzer, 1973).

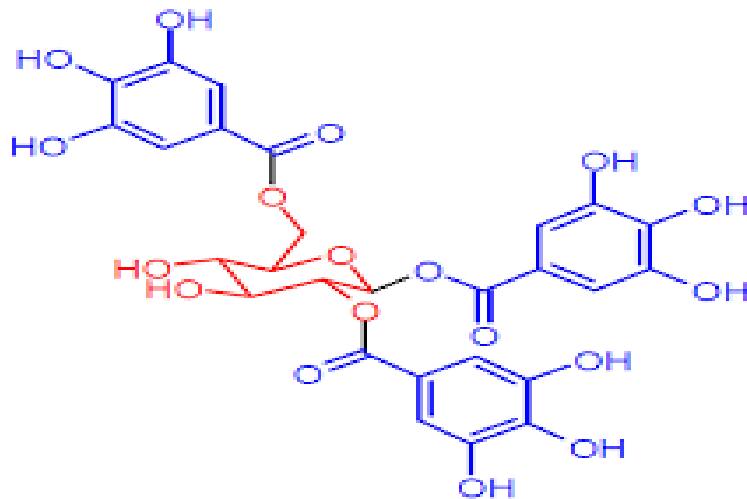


Figura 1. Estrutura química de um tanino hidrolisável.

O metabolismo microbiano e a digestão gástrica convertem esses taninos em compostos metabólicos de baixo peso molecular. Alguns desses metabólitos são tóxicos e estão associados a hemorragias gastro-entéricas e necrose do fígado e rins, principalmente em monogástricos (Cannas, 2019).

2.6.2. Taninos Condensados (TC)

Os taninos não hidrolisáveis ou condensados (flavolanos) são polímeros dos flavonoides (Sgarbieri, 1996), formados predominantemente por unidades de flavan-3-ols (catequina) e flavan 3,4-diols (leucoanto-cianidina) unidas através de ligações carbono-carbono (Figura 2) não susceptíveis de quebra por hidrólise. Como consequência não são absorvidos pelo trato gastrointestinal (Cannas, 2019).

Os taninos condensados são mais difíceis de serem degradados que os hidrolisáveis, podendo ser tóxicos para uma variedade de microrganismos. Isto pode explicar o efeito destas moléculas em retardar a biodegradação e diminuir a decomposição da matéria orgânica (Bhat et al., 1998).

Os TC apresentam uma rica diversidade estrutural que pode afetar suas propriedades biológicas, como a capacidade de ligação às proteínas (Mueller-

Harvey, 1992). Estão presentes principalmente em plantas lenhosas e na fração fibra alimentar de diferentes alimentos como cereais e leguminosas, nos quais são responsáveis por efeitos adversos na cor, sabor e qualidade nutricional (Serrano et al., 2009). Por exemplo, castanheiras e acácias são conhecidas por produzirem ambos os taninos, condensados e hidrolisáveis (Mueller-Harvey, 2006).

Informações quanto a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos polifenóis são escassos (Efrain et al. 2011; Manach et al., 2004). O intestino delgado é o principal local de absorção dos TH sendo fermentados em menor quantidade no cólon (Bravo, 1998; Saura-Calixto et al., 2007). São geralmente excretados na urina e bile (Bravo, 1998). A absorção dos TC no intestino delgado seria limitada pela formação de complexos com proteínas, amido e enzimas digestivas (Manach et al., 2004; Serrano et al., 2007). No cólon, os TC que apresentam baixo peso molecular são degradados em fenóis simples ou excretados nas fezes (Jardini & Mancini Filho, 2007), enquanto os com alto peso molecular e alta polimerização não são afetados pela microbiota (Bravo, 1998). A microbiota intestinal pode degradar ácido gálico e metabólitos de proantocianidinas, pequenas quantidades podem ser detectadas nos resíduos do cólon após fermentação (Bravo, 1998; Hagerman & Butler, 1981; Mueller-Harvey, 2006; Saura-Calixto et al., 2007).

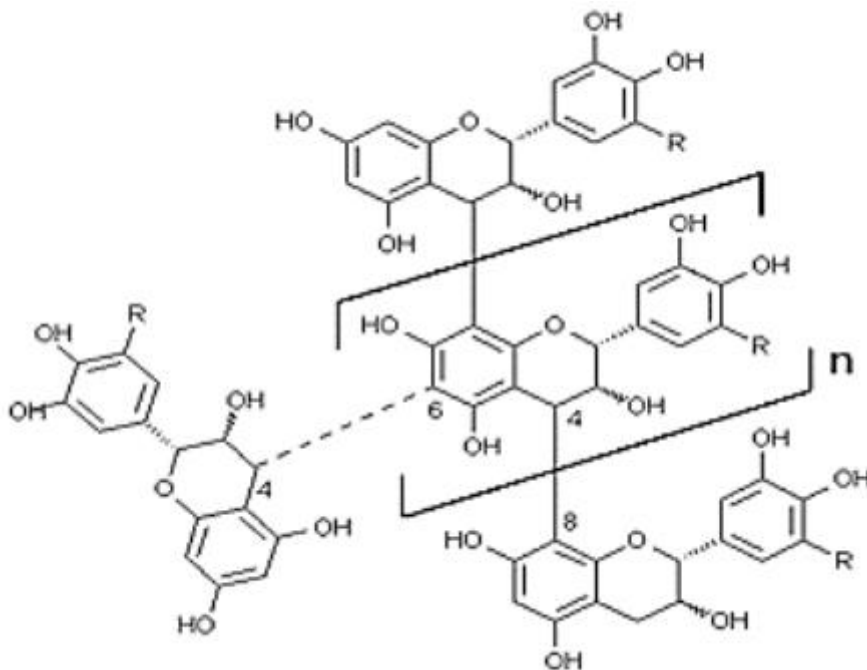


Figura 2. Estrutura química de um tanino condensado.

2.7. Efeito do uso de taninos na alimentação animal

Os taninos presentes nos vegetais utilizados na nutrição de diversas espécies animais podem apresentar efeitos deletérios e benéficos quanto à saúde e à produção animal. Acredita-se que os efeitos biológicos dos taninos possam ocorrer de duas maneiras (Serrano et al., 2009):

- (i) como uma estrutura complexa e inabsorvível, produz efeitos locais no TGI (ação antioxidante e sequestro de radicais livres, ação antibacteriana e antinutricional);
- (ii) como taninos absorvíveis (provavelmente com baixo peso molecular) e metabólitos produzidos através da fermentação da microbiota, afetam vários órgãos.

Devido à característica adstringente dos taninos, pode ocorrer redução na ingestão de alimentos e na produtividade animal (Beelen et al., 2008). A adstringência é a sensação causada pela formação de complexos entre os taninos, proteínas salivares e o epitélio mucoso da cavidade oral ou através da ligação direta dos taninos com os receptores gustativos (Beelen et al., 2008). A precipitação das proteínas salivares reduz as propriedades lubrificantes da saliva, causando a sensação de boca seca e afetando a ingestão do alimento (Mueller-Harvey, 2006). As prolinas da saliva possuem características hidrofóbicas e contribuem para a conformação mais aberta da molécula de proteína e apresentam alta afinidade pelos taninos (Soares et al., 2012). As prolinas foram encontradas na saliva de humanos, suínos, ratos, coelhos e cabras estando ausentes em hamsters e em níveis baixos em ovinos e bovinos (Mueller-Harvey, 2006). O nível de prolina salivar nos herbívoros e possivelmente em humanos é regulado pela exposição frequente aos TC presentes na dieta (Da Costa et al., 2008; Mueller-Harvey, 2006).

O aumento das concentrações de taninos nas dietas afeta negativamente o consumo e o ganho de peso diário em frangos (Kubena et al., 2001). Portanto tem se buscado níveis de inclusão que não afetem o desempenho dos animais e ainda assim apresentem efeitos benéficos. Concentrações de menos de 1 g/kg são consideradas baixas, 1 a 3 g/kg medianas e acima de 4 g/kg são consideradas altas. No entanto os efeitos em relação à dose podem variar dependendo do tipo de tanino empregado (Jansman, 1993).

Os taninos afetam a digestibilidade da dieta ao formar complexos com proteínas, carboidratos, macromoléculas e outros polímeros, precipitando-os. Dietas ricas em taninos podem reduzir a atividade biológica de várias enzimas como tripsina, α -amilase, β -glucosidase, lipase, entre outras (Serrano et al., 2009). Podem complexar as proteínas da dieta, que deixam de estar acessíveis às proteases reduzindo a digestibilidade da proteína bruta, inibir o crescimento microbiano do rúmen ou cólon e formar complexos insolúveis com o substrato presente (Beelen et al., 2008; Molina et al., 2003; Serrano et al., 2009).

O consumo de tanino também produz efeitos positivos aos animais e humanos. Esses efeitos são dependentes de fatores como tipo e quantidade de tanino ingerido, absorção, metabolismo e espécie animal (Manach et al., 2004). A ação antioxidante ocorre pela habilidade em doar hidrogênio ou elétrons e pelos radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, como os ácidos graxos e óleos (Hagerman et al., 1998; Wang 2019).

Acredita-se que as proantocianidinas encontradas em chás e vinhos sejam potenciais cardioprotetores e que, provavelmente ao inibirem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, reduzem o colesterol plasmático e o risco de aterosclerose (Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Serrano et al., 2009). A atividade inibidora do crescimento de micro-organismos se deve ao fato dos taninos complexarem-se com facilidade a íons metálicos, sequestrando-os do meio, impedindo que sejam utilizados como cofatores enzimáticos pelas bactérias (Monteiro et al., 2005; Scalbert, 1991;) e pode afetar a excreção de ferro através e desta forma afetando o plasma sanguíneo (Lee et al., 2010).

2.8. ZINCO COMO ADITIVO ANTIMICROBIANO

Os íons metálicos são essenciais para que todos os organismos sobrevivam no meio ambiente ou no hospedeiro. Os íons metálicos são necessários em muitos processos biológicos como componentes de metaloproteínas e servem como cofatores ou elementos estruturais para enzimas. No entanto, é fundamental do ponto de vista do crescimento microbiano, que as bactérias assegurem que a absorção e a disponibilidade do metal estejam de acordo com suas necessidades, uma vez que o desequilíbrio na homeostase pode comprometer seu crescimento.

Com o aumento da restrição do uso de fármacos como antimicrobianos, tem aumentado o uso de sais metálicos como substitutos, sendo os de zinco (Zn) e Cobre (Cu) os de maior eficácia. O Zn vem sendo utilizado em doses farmacológicas desde o início dos anos 90, adicionado na forma de óxido, por duas a três semanas, porque promove aumento do ganho de peso e reduz a ocorrência de diarreia em leitões após o desmame (Botelho et al., 1996; Lima et al., 1996). Contudo, o uso de Zn, em doses muito acima dos níveis exigidos pelos animais (2400 a 3200 mg/kg) sempre foi um assunto de discussão porque, embora promova redução da ocorrência de diarreia e aumento no ganho de peso nos leitões, é um metal pesado que pode ser tóxico nessas concentrações além da maior parte ser eliminada nas fezes (Cristani, et al., 1997) podendo se acumular no solo, com risco de poluição ambiental e contaminação da água. Além disso, as altas concentrações de Zn no alimento podem acarretar o desenvolvimento da resistência antimicrobiana ((Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), 2017; Organização Mundial da Saúde (OMS) 2017), e podem regular a expressão de genes que modificam a resposta imune dos leitões (Debski, 2016).

Estudos demonstraram que Zn e Cu utilizados em altas concentrações por um período mais longo podem promover a propagação da resistência antimicrobiana da microbiota intestinal em suínos (Holzel et al., 2012). Foi demonstrado que a exposição prolongada a doses farmacológicas de Zn pode aumentar a resistência em alguma forma de microrganismos, inclusive *Escherichia coli* multirresistente em leitões tratados por quatro semanas com 2500 mg/kg na dieta, na forma de ZnO (Bednorz et al., 2013). O uso prolongado de metais pesados, como Zn, oferece pressão seletiva sobre bactérias resistentes a antimicrobianos, e essa é uma razão pela qual o uso de altas doses destes metais pode desempenhar um papel na manutenção da resistência antimicrobiana (Holman & Chenier, 2015).

O mecanismo de ação do Zn contra a diarreia ainda não é bem compreendido, mas há várias hipóteses. Alguns autores sugeriram que altas concentrações de Zn dietético diminuem a permeabilidade intestinal, impedindo a translocação de bactérias patogênicas através da barreira intestinal (Zhang & Guo, 2009). No entanto, no tratamento da diarreia, apenas altas doses farmacológicas de ZnO são eficientes. O Zn aumenta a síntese de IgA no intestino e reduz a translocação de bactérias tanto anaeróbicas como produtoras de ácido láctico nos linfonodos mesentéricos (Broom et al., 2006). *In vitro*, o ZnO reduz a expressão de genes

ligados a citocinas anti-inflamatórias, que são estimuladas por *E. coli* enterotóxicas. O Zn também protege a integridade da membrana intestinal através da redução da adesão e invasão de *E. coli* enterotóxicas (Roselli et al., 2003).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses:

1. Os taninos condensados melhoram o desempenho dos leitões e a digestibilidade das dietas;
2. Os taninos condensados melhoram a composição do microbioma, e influenciam as respostas anti-inflamatórias dos leitões;
3. Os taninos condensados diminuem a ocorrência de diarreias nos leitões;
4. Os taninos condensados são uma alternativa a aditivos antimicrobianos.

Objetivo:

Avaliar se a adição de composto de taninos condensados em dois níveis suplementar de 1 g/kg e 2 g/kg de ração melhora o desempenho, a digestibilidade, a composição da microbiota intestinal e a diarreia em suínos na fase creche alimentados com uma dieta simples e avaliar se estas concentrações influenciam a produção de citocinas anti-inflamatórias.

CAPÍTULO II

**USE OF CONDENSED TANNINS IN WEANED PIGLETS CHALLENGED BY A
SIMPLE DIET**

Este capítulo é apresentado conforme as normas de publicação da revista

Animal Feed and Science Technology

USE OF CONDENSED TANNINS IN WEANED PIGLETS CHALLENGED BY A SIMPLE DIET

L.M. Vilella^{ac}, P.B. Brasil^b, A.M.L. Ribeiro^a

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Departamento de Zootecnia, Av. Bento Gonçalves, 7712 – 91540-000 – Porto Alegre, RS – Brasil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Av. Bento Gonçalves, 9090 – 91540-000 – Porto Alegre, RS – Brasil.

^c Corresponding author: Lucas Vilella E-mail: lucas-vilella@hotmail.com

RESUMO

Foi avaliado o efeito de um composto de taninos condensados em leitões com 21 dias de idade recebendo dietas simples à base de milho e farelo de soja. Foram usados 32 leitões com peso médio inicial de $6,3 \pm 0,78$ kg, oito animais por tratamento, distribuídos em quatro tratamentos: Controle negativo - dieta basal com 80 ppm de óxido de zinco; Controle positivo - dieta basal com 2500 ppm de óxido de zinco, Taninos condensados 1 g/kg e 2 g/kg – Controle negativo com inclusão de 1 g/kg ou 2 g/kg de composto de taninos condensados. Duas dietas basais foram formuladas para as fases pré-inicial (1 a 14 dias pós-desmame) e inicial (15 a 28 dias pós-desmame), com 70 e 35 g/kg de lactose e 360 a 373 g/kg de farelo de soja, respectivamente e sem zinco suplementar. Foi avaliado o desempenho (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar), digestibilidade aparente do trato total para matéria seca, energia, proteína, retenção de nitrogênio e metabolizabilidade da energia, ocorrência de diarreia e avaliação do escore fecal. Também foi feita avaliação do microbioma intestinal e da presença de citocinas anti-

inflamatórias (IL4 e IL-10). Aos 28 dias, quatro animais por tratamento, foram eutanasiados e uma amostra de 3mL do conteúdo cecal foi coletada para análise de microbioma intestinal e um segmento de 5 cm do trato, situado entre o jejuno-íleo para análise de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), ambos armazenados a -80°C. Do conteúdo cecal foi extraído o DNA com o kit ZR fecal DNA MiniPrep da Zymo®, quantificado, amplificado e seqüenciado pelo “MiSeq” Illumina® e posteriormente analisado na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). A análise de citocinas foi feita através de qPCR. Não houve diferença estatística para as respostas de desempenho e para os coeficientes de digestibilidade nos períodos avaliados. As fezes produzidas pelos leitões que receberam dietas com taninos apresentaram-se mais úmidas ($P < 0,001$). Os tratamentos com tanino não promoveram maior produção de IL-4 e IL-10 aos 28 dias. No entanto, o tratamento com 2 g/kg de composto de taninos condensados, proporcionou uma maior razão *Firmicutes/Bacteroidetes* o que indica modulação benéfica na microbiota gastrintestinal. O mesmo tratamento mostrou maior incidência dos gêneros *Mitsuokella* e *Acidaminococcus*, que podem ser benéficos para o desempenho subsequente destes animais. O uso de taninos condensados, sobretudo no nível de 2 g/kg de ração, apresenta benefícios para leitões em situações de desafio intestinal.

Palavras chaves: Escore fecal; Diarreia; Digestibilidade; Saúde intestinal; Metabolismo; Microbiota.

ABSTRACT

The effect of a compound of condensed tannins in pigs at 21 days of age receiving simple diets was evaluated. Thirty-two piglets (6.3 ± 0.78 kg initial average weight), eight animals per treatment, were distributed in four treatments: Negative control - basal diet with 80 ppm of zinc oxide; Positive control - basal diet with 2500 ppm of zinc oxide; Condensed tannins 1 g/kg and 2 g/kg - Negative control with inclusion of 1 g/kg or 2 g/kg of condensed tannin compound. Two basal diets were formulated for the pre-initial (1 to 14 days post-weaning) and initial (15 to 28 days post-weaning) phases, with 70 and 35 g / kg of lactose and 360 to 373 g / kg of bran soybeans, respectively and without supplemental zinc. Performance (feed intake, weight gain and feed conversion), the apparent digestibility of the total tract for dry matter, energy, protein, nitrogen retention, energy metabolisability, the occurrence of diarrhea and the evaluation of fecal score were evaluated. At the end of the experiment, four animals per treatment were euthanized and sections of the gastrointestinal tract were identified and isolated to avoid transit of content. A sample of 3 mL of cecal content and a 5 cm segment of the tract, located between the jejunum-ileum were collected and stored at -80°C for intestinal microbiome and anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) analysis, respectively. From the cecal content DNA was extracted by Zymo DNA MiniPrep fecal ZR kit®. quantified, amplified and sequenced by "MiSeq" Illumina® and subsequently analyzed on the QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) platform. Cytokine scans were performed using qPCR. There was no statistical difference for performance responses and digestibility coefficients in the evaluated periods. The feces produced by piglets that received diets with tannins were wetter ($P < 0.01$). The treatments with tannin did not promote higher production of IL-4 and IL-10 at 28 days. However, the treatment with 2 g/kg of condensed tannin compound provided a higher *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, which indicates beneficial modulation in the gastrointestinal microbiota. The same treatment showed a higher incidence of the genera *Mitsuokella* and *Acidaminococcus*, which may be beneficial to performance. The use of condensed tannins mainly at the level of 2 g/kg of feed has benefits for piglets in a challenging intestinal media.

Key words: Diarrhea; Digestibility; Fecal score; Intestinal health; Metabolism; Microbiome.

INTRODUÇÃO

O risco de resistência antimicrobiana levanta preocupação na saúde animal e humana (Gresse et al., 2019). Portanto, têm surgido medidas quanto ao uso prudente de antimicrobianos e pela busca de novas soluções para prevenir e tratar infecções (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2017). Aditivos baseados em níveis farmacológicos de zinco e cobre em níveis que variam entre 2000 a 3000 ppm, também são utilizados na fase pós-desmame. Porém, é recomendada a diminuição do uso desses minerais devido à suspeita de resistência bacteriana e o impacto destes metais no meio ambiente (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar - EFSA, 2017; OMS, 2017).

O manejo e a melhoria nutricional são as estratégias dominantes para reduzir o estresse do desmame na produção de suínos (Modina et al., 2019). A busca por alternativas tem demonstrado que os extratos vegetais possuem diversas capacidades antibióticas e imuno-estimulantes e de redução de estresse (Costa et al., 2007). Dentre estas alternativas, destacam-se os taninos, que são compostos de polifenóis provenientes do metabolismo secundário das plantas, classificados em dois grupos distintos: taninos hidrolisáveis, constituídos de fenóis simples e taninos condensados, também denominados proantocianidinas, formados por oligômeros e polímeros de flavonóides. Os taninos condensados, são encontrados em maior abundância na natureza (Battestin et al., 2004) e quando ingeridos possuem a capacidade de formar ligações com proteínas, celulose e pectina para formar complexos insolúveis. Além disso, precipitam alcalóides e gelatinas e interagem com polissacarídeos e enzimas envolvidas na digestão de proteínas e carboidratos (Battestin et al., 2004). Devido a estas características eles são conhecidos por possuírem propriedades antinutricionais, principalmente na alimentação de não ruminantes. No entanto, estas mesmas propriedades fazem deles compostos com efeitos antibacterianos, antivirais e antidiarreicos (Min et al., 2007, Wang et al.,

2009). Vários estudos têm demonstrado que a utilização de rações suplementadas com baixas concentrações de taninos promove a saúde animal e o desempenho zootécnico de leitões desmamados, suínos em crescimento e frangos de corte (Biagi et al., 2010; Brus et al., 2013; Starcevic et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de dois níveis suplementares de um composto de taninos condensados- 1 g/kg e 2 g/kg de ração-, e seus efeitos sobre desempenho, digestibilidade aparente do trato total, ocorrência de diarreia, composição do microbioma e das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 de leitões alimentados com dietas simples.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, instalações e tratamentos.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob nº 4496. Foram utilizados 32 suínos machos inteiros, de genética comercial (Landrace x Large White), com 21 dias de idade, e peso médio inicial de $6,3 \pm 0,78$ kg. O experimento constituiu-se por quatro tratamentos, com 8 repetições cada, assim distribuídos: Controle negativo - Dieta basal, com 80ppm de zinco; Controle positivo - Dieta basal com 2500ppm de zinco e Composto de taninos condensados (CTC) 1 g/kg de ração e CTC 2 g/kg de ração - Dieta igual ao controle negativo com suplementação de composto comercial com 70% de taninos condensados extraídos da casca de acácia negra (*Acacia decurrens*), através do cozimento da casca e secagem pelo processo de spray-dry.

Foram formuladas dietas para a fase pré-inicial (1 a 14 dias pós desmame) e inicial (15 a 28 dias pós desmame) de acordo com o NRC (2012), porém, com o objetivo de desafiar os animais nutricionalmente (Tabela 1). Desta forma, foram incluídos níveis baixos de lactose (70 g/kg e 35 g/kg de ração, dieta pré-inicial e

inicial, respectivamente), uma maior quantidade de farelo de soja do que o preconizado para a idade (360 e 373 g/kg de ração) para as dietas também foi formulado dois tipos de premixes que se diferenciaram apenas quanto ao nível de óxido de zinco (ZnO), um com 2500 ppm de ZnO e o outro com nenhum nível suplementar de ZnO. Os animais foram alojados em gaiolas de metabolismo semelhantes às descritas por Pekas (1968) medindo 1,60 x 1,27 x 0,56 m, com piso e laterais metálicas, equipadas com bebedouros e comedouros metálicos, localizadas dentro de uma sala experimental com janelas e equipadas com equipamento de aquecimento e controle de temperatura. Inicialmente foram alojados em duplas para se adaptarem e, após 3 dias, foram alojados individualmente, no momento do início da fase experimental.

Cada fase do experimento teve 14 dias de duração totalizando 28 dias. A oferta de água e alimento foi *ad libitum* durante todo o período experimental e a temperatura foi controlada de maneira a garantir um ambiente termoneutro para os animais (Oliveira et al., 1993), com presença de luz 24 horas.

Desempenho e digestibilidade

Foram registradas a oferta e sobras de ração, que foram coletadas, secas e quantificadas para determinar o consumo de ração (CR). Os animais foram pesados individualmente nos dias 0,7,14,21 e 28 dias pós desmame para avaliar o ganho de peso corporal, estas medidas foram utilizadas para calcular o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar ($FC = FI/WG$). As medidas de digestibilidade foram feitas nas duas fases (pré-inicial e inicial) e em cada uma considerou-se 7 dias para adaptação às dietas e 7 dias para a coleta. Dietas marcadas com 2,5 g/kg de óxido férrico (FeO) na fase pré-inicial e 5 g/kg de FeO na fase inicial foram fornecidas aos animais para sinalizar o início e o final do período de coletas.

Nos dois períodos experimentais as fezes e urina foram coletadas diariamente às 08h. As fezes coletadas, foram pesadas e congeladas a -10°C. Após a conclusão do período experimental foram descongeladas, homogeneizadas e subamostradas para as análises. A urina foi drenada para baldes de plástico contendo 5 ml de H₂SO₄ PA. O material recolhido foi pesado e uma amostra de 20% da quantidade total de urina foi acondicionada em garrafas plásticas higienizadas e identificadas para serem congeladas.

Todas as análises foram feitas de acordo com o AOAC (2006), sendo: a análise de matéria seca (MS) (método 2001.12), de nitrogênio (%N) das fezes e urina (métodos 976.05 e 994.19), e a energia bruta (EB) das fezes e urina foram determinadas por um calorímetro de bomba de oxigênio isoperibólica automática (Parr 1281, Automatic Energy Analyzer; Moline, IL, EUA). Estes valores foram utilizados para os cálculos da digestibilidade aparente do trato total, conforme Moreira et al (1994):

Coefficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS g/kg)

$$\text{CDMS g/kg} = \frac{(\text{Consumo de MS (kg/MS)} - \text{Fezes (kg/MS)})}{\text{Consumo de MS (kg/MS)}} \times 100$$

$$\text{Consumo de MS (kg/MS)}$$

Coefficiente de digestibilidade aparente da Energia Bruta (CDEB g/kg)

$$\text{CDEB g/kg} = \frac{(\text{Consumo de GE MJ/kg} - \text{GE fezes MJ/kg})}{\text{Consumo de GE MJ/kg}} \times 100$$

$$\text{Consumo de GE MJ/kg}$$

Coefficiente de metabolisabilidade aparente da energia Bruta (CMEB g/kg)

$$\text{CMEB g/kg} = \frac{(\text{Consumo de EB MJ/kg} - \text{GE fezes MJ/kg} - \text{GE urina MJ/kg})}{\text{Consumo de EB MJ/kg}} \times 100$$

Consumo de EB MJ/kg

Coefficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDPB g/kg)

$$\text{CDPB g/kg\%} = \frac{(\text{Consumo de PB kg/MS} - \text{PB das fezes kg/MS})}{\text{Consumo de PB kg/MS}} \times 100$$

Consumo de PB kg/MS

Coefficiente de retenção de nitrogênio (CRN g/kg)

$$\text{CRN g/kg} = \frac{(\text{N ingerido g} - \text{N das fezes g} - \text{N urina g})}{\text{N ingerido g}} \times 100$$

N ingerido g

Escore de consistência fecal

Foram observadas durante cada período a presença e a gravidade de diarreia usando o escore de consistência fecal (CF) como medida, com base no sistema de pontuação descrito por Marquardt et al. (1999). A pontuação consistiu em: fezes secas = 1, fezes normais=2, fezes moles = 3 e diarreia = 4. As observações foram feitas diariamente antes da limpeza das gaiolas, no período da manhã e sempre pelo mesmo observador.

Microbioma e expressão gênica de IL – 4 e IL-10

Ao final do segundo período experimental, 4 animais por tratamento, total de 16 animais, foram eutanasiados. Os animais selecionados sofreram eletronarcole e após sangria com um corte na artéria braquial, para evitar a presença de sangue na cavidade abdominal. Utilizou-se um lacre plástico no piloro e no reto para o isolamento do trato gastrointestinal a fim de evitar a perda de conteúdo visceral, após foi feita a identificação dos segmentos jejuno, íleo e ceco, também isolados com lacres para evitar o fluxo de conteúdo entre os compartimentos.

Uma amostra de 3 mL do conteúdo cecal foi coletada e armazenada em criotubos em ultrafreezer a -80°C. Para esta coleta foi feita a abertura e raspagem

com cuidado do conteúdo do ceco. Para análise de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) foram coletados 5 cm de tecido intestinal, situado entre o jejuno e íleo., A coleta desse material foi realizada de forma asséptica e o material foi imediatamente alocado em criotubos que foram mergulhados em nitrogênio líquido. Após as amostras foram armazenadas a -80°C em ultra freezer, até o momento da análise.

Foi empregado o kit comercial ZR fecal DNA MiniPrep® da Zymo Research para extrair o DNA das amostras cecais. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm. Para avaliar a integridade do DNA extraído todas as amostras foram corridas por eletroforese em gel agarose 1%.

Foi amplificado um segmento de 250 bases da região hipervariável V4 do gene ribossomal 16S rRNA utilizando-se os primers universais 515F e 806R e as seguintes condições de PCR: 94°C por 3 min; 18 ciclos de 94°C por 45 seg, 50°C por 30 seg e 68°C por 60 seg; seguido de 72°C por 10 min. A partir destes amplificados foi construída a biblioteca metagenômica utilizando-se o kit comercial “Nextera DNA Library Preparation Kit” da Illumina®. Os amplificados foram reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina® (Degnan and Ochman, 2012).

As leituras ou “reads” obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2011, 2010). As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), neste caso, a homologia entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar as sequências foi utilizada a atualização (SILVA 128) do ano 2017 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA database (Yilmaz et al., 2014).

A expressão de citocinas do segmento jejuno-íleo foi avaliada por qPCR, utilizando primers específicos para cada alvo. Cada combinação de alvo e amostra, gera uma medida relativa da concentração de RNA mensageiros (mRNA) específicos do alvo na amostra.

Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos de oito repetições. Cada gaiola com um animal representou uma unidade experimental. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Minitab (2019). Os dados de desempenho e digestibilidade foram submetidos ao teste de Ryan-Joiner para avaliar sua normalidade de distribuição. Em seguida, a ANOVA foi realizada através do procedimento GLM. Os dados de escore fecal foram feitos pelo teste de qui-quadrado com significância a $P < 0.05$ para diferenças entre tratamentos dentro das pontuações e, ANOVA para os escores fecais.

Para as análises de microbioma e citocinas foram aplicados os testes não paramétricos Kruskal-Wallis, Mann Whitney, e a ANOVA, com post hoc de Tukey-Kramer, com correção de Benjamini Hochberg FDR. Também foi utilizada a análise de componente principal (PCA), que é uma técnica de análise multivariada e pode ser usada para analisar inter-relações entre muitas variáveis e explicar essas variáveis em termos de suas dimensões inerentes (componentes). É matematicamente definida como uma transformação linear ortogonal dos dados para um sistema de coordenadas de forma que a maior variância fica ao longo da primeira coordenada (primeiro componente), a segunda maior variância na segunda coordenada e assim por diante. Ao aplicarmos esta análise aos dados de microbioma, é possível identificar amostras com perfil semelhantes quando

consideradas todas as informações geradas pela amostra, pela sua localização no gráfico.

RESULTADOS

Desempenho zootécnico e digestibilidade aparente do trato total e escore fecal

Peso inicial (BW kg), consumo de ração (FI g day⁻¹), ganho de peso (WG g day⁻¹), conversão alimentar (FCR = WG/FI) e peso final (BW kg), não apresentaram diferença entre os tratamentos em nenhum dos períodos analisados, bem como no período total (Tabela 2).

A digestibilidade aparente do trato total (ATTD) para matéria seca (DM), energia bruta (GE), proteína bruta (CP), metabolisabilidade da energia bruta (MGE) e retenção de nitrogênio (NR) nos dois períodos analisados também não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3).

Quanto ao escore fecal (Tabela 4), a análise estatística mostrou que os tratamentos com taninos tiveram um valor de escore maior ($P < 0.001$), do que os tratamentos controle negativo e positivo.

Citocinas

Não foram identificadas diferenças para a presença de IL-4 e IL-10, nas amostras de tecido do jejuno-íleo dos suínos aos 28 dias do período experimental, na comparação das médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) ou pelo teste de Mann Whitney ($P < 0.05$).

Microbioma

A Figura 3 apresenta a análise de componentes principais (PCA) dos filos e famílias bacterianas nas amostras de conteúdo cecal. A distância entre dois pontos indica o grau de identidade entre eles. Os gráficos de PCA foram gerados comparando os perfis taxonômicos de filo e família, considerando todos os

microrganismos identificados. O gráfico foi anotado manualmente com círculos para mostrar a agregação dos dados de cada grupo experimental no PCA com dados de famílias.

Os filios de maior abundância identificados nas amostras são *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria*, *Euryarcheota* (domínio *Archaea*) e *Acidobacteria* (Figura 4).

Considerando grau taxonômico de filo, alguns clados específicos apresentaram proporção de sequências (%) estatisticamente diferentes entre os quatro grupos analisados. O Filo *Bacteroidetes* apresentou menor proporção de sequências no CTC 2 g/kg do que nos demais grupos (Figura 5), enquanto o filo *Firmicutes* apresentou maiores proporções em CTC 2 g/kg do que nos demais grupos analisados (Figura 6). A razão entre *Firmicutes/Bacteroidetes* está apresentada na Tabela 5. Pela análise de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$), houve diferença entre as médias do grupo Controle negativo e CTC 2 g/kg, sendo CTC 2 g/kg o grupo de maior razão *Firmicutes/Bacteroidetes*.

Dentre as famílias identificadas, não houve diferença entre os grupos e entre os gêneros. O gênero *Mitsuokella* (Família *Veillonellaceae*, Filo *Firmicutes*) e o gênero *Acidaminococcus* (Família *Acidaminococcaceae*, Filo *Firmicutes*), ambos da classe *Negativicutes*, apresentaram maior incidência em CTC 2 g/kg do que nos demais grupos (Figura 7 e 8, $P < 0.01$) e o gênero *Parabacteroides* (Família *Porphyromonadaceae*, Filo *bacteroidetes*) apresentou maior incidência no Controle negativo e Controle positivo do que o observado para os grupos CTC 1g/kg e 2 g/kg (Figura 9, $P < 0.01$).

DISCUSSÃO

Os taninos têm a capacidade de interagir com polissacarídeos e podem inibir enzimas relacionadas à digestão de carboidratos (α -amilase, α -glicosidases), de lipídios (lipase pancreática e gástrica) e de proteínas (tripsina e proteases diversas), além de complexar-se com carboidratos e outras macromoléculas reduzindo o valor nutricional das dietas (McDougall et al., 2005, Nunes et al., 2001).

A inclusão de doses baixas de tanino hidrossolúveis 1,1; 2,3 e 4,5 g/kg de ração na dieta de suínos, por um período de 28 dias, não influenciou o peso vivo do animal e o consumo médio de ração (Biagi et al., 2010). No entanto, o mesmo estudo relatou um maior ADG e conversão alimentar (FE) ao longo dos 28 dias de teste em comparação com o grupo controle negativo. Girard (2018) utilizou uma dose 1g/kg de ração de tanino hidrolisável de casca de castanha na dieta de suínos com 21 dias e observou uma redução na pontuação média do escore fecal dos leitões com diarreia e na duração da mesma, sem alterações no consumo de ração e no ganho médio diário.

Dados da literatura demonstram que a suplementação média de taninos (\geq 1g/kg) parece ser mais eficaz no crescimento de leitões desmamados em comparação com uma baixa inclusão ($<$ 1 g/kg) (Biagi et al., 2010; Brus et al., 2013; Girard & Bee, 2020, Girard et al., 2018, , Frankic & Salobir, 2011). A maioria dos efeitos benéficos dos taninos estão relacionados a uma melhora do ganho médio diário, consumo de ração e melhora na conversão alimentar.

Os resultados encontrados em nosso trabalho mostraram que este composto de tanino condensado em ambos os níveis de inclusão (1 g/kg e 2 g/kg) não interferiu negativamente na digestibilidade da dieta como pode ser observado na tabela 3. Em trabalhos que se utilizou dietas complexas, caracterizadas por

incluïrem alimentos de alta palatabilidade, alta digestibilidade, baixa antigenicidade e alta concentrações de nutrientes (Branco et al., 2006), foi observado um coeficiente de digestibilidade na Matéria Seca na ordem de 0,85 (Arnaiz et al., 2009; Ribeiro et al., 2016; Vieira et al, 2015), enquanto a digestibilidade média da MS encontrada no presente trabalho foi de 0,76, demonstrando que a dieta proposta efetivamente foi menos aproveitada. Em nosso trabalho também não foi observado efeito negativo no desempenho zootécnico entre os tratamentos, porém observa-se que o ganho de peso e a conversão alimentar ficaram abaixo da média esperada para a idade. Ribeiro et al. (2016); Vieira et al. (2015) e Arnaiz et al. (2009), em estudos conduzidos também em gaiolas metabólicas obtiveram GPD de 540 g/dia e CA de 1,20 em 28 dias de experimento para leitões de mesma idade. Mesmo com dietas desafiadoras contendo 10% de cevada, leitões em condições semelhantes tiveram GPD de 490 g e CA de 1,24 (Vieira et al., 2017). Nossos resultados mostram ganho de peso médio de 380 g/dia e conversão alimentar de 1,40. O pior desempenho observado está associado à dieta simples, principalmente no que diz respeito à falta de ingredientes de origem láctea. Segundo Quadros et al. (2002) o uso de dietas complexas proporciona maior consumo de ração (CDR) e maior GDP, no pós-desmame em relação a dietas simples. Por outro lado, o fato do CDR não ter diminuído nos tratamentos com tanino, é uma resposta importante visto o tanino ser considerado adstringente na boca, o que poderia causar rejeição à dieta (Candek-Potokar et al. 2015).

Segundo Kil & Stein (2010) no período de desmame ocorre uma mudança brusca no perfil nutricional do alimento fornecido bem como no ambiente, gerando diversos fatores de estresse que favorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas e predispondo os animais a problemas produtivos, especialmente a

diarreia. Estudos feitos por Liu et al. (2020) usando taninos hidrolisáveis como suplementação (1 g/kg) e óxido de zinco (ZnO, 2000 mg/kg) demonstraram que os taninos promoveram uma redução na taxa de diarreia dos suínos recém-desmamados (21 dias), além do aumento do IgM sérico, o que seria benéfico para a prevenção da diarreia.

No presente estudo, os taninos também resultaram na presença fezes mais úmidas que os outros grupos, porém, não apresentaram fezes diarreicas. Este efeito pode ser devido à capacidade dos taninos de formar uma película fina nas paredes do intestino que atuaria sobre a adesão das bactérias ao epitélio intestinal (Liu et al. 2020) e da capacidade de atuarem sobre as enterotoxinas e canais envolvidos na secreção de eletrólitos e água no lúmen intestinal (Girard & Bee, 2020).

A microbiota do trato gastrointestinal tem um importante papel em manter a homeostase e o desenvolvimento do sistema imunológico dos animais (Lalles et al., 2007). Por outro lado, o desequilíbrio da microbiota, conhecido como disbiose pode se tornar um fator essencial para o desencadeamento de doenças infecciosas e não infecciosas, e levar a uma ativação excessiva de citocinas inflamatórias e, conseqüentemente desregulação do sistema imune (Sekirov et al. 2010). Em experimentos, *tanto in vivo* quanto *in vitro*, a resposta dos taninos sobre o estado anti-inflamatório e imunológico mostrou efeitos promissores quando os animais foram expostos a estressores como o desafio por lipopolissacarídeos, desafio bacteriano, estresse térmico ou células intestinais expostas ao peróxido de hidrogênio e sulfato de sódio dextrano (Liu et al., 2018; Park et al., 2014; Reggi et al., 2020). Segundo Liu et al. (2018), taninos hidrolisáveis ou condensados são

capazes de modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias intestinais atuando também na barreira intestinal e *Tight junctions*.

Em geral o sistema imune reage aos antígenos gerando a ativação de processos inflamatórios e resposta imunológica que levam à repartição dos nutrientes, principalmente energia e proteína, aumento na taxa metabólica basal, maior utilização de energia obtida dos alimentos e desviada ao sistema imune e tecidos periféricos (Klasing, 1998). Esta é induzida ou regulada por citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α) e outros componentes imunológicos. Este quadro é acompanhado pela queda no consumo de alimento e elevação da temperatura corporal. No entanto, em resposta, há a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-5 e IgE) que inibem este processo. Tanto a interleucina IL-4, como a IL-10 tem importante função de inibir a síntese de outras citocinas, embora a IL-4 atue também na construção da resposta imune Th2 (resposta humoral) enquanto a IL-10 inibe a proliferação de Th1 (resposta citotóxica) (Omanakuttan et al., 2020; Abbas et al., 2017).

Neste experimento não houve expressão das citocinas IL-4 e IL-10. Talvez o modelo experimental que foi proposto por desafio intestinal pelo aumento de fatores anti-nutricionais presentes do farelo de soja (PNAS, glicinina, conglucina), pode não ter sido suficiente para desafiar o sistema imune, traduzindo-se num processo inflamatório, que justificasse o aumento dos níveis das duas citocinas medidas (Figura 1 e 2).

Os filos identificados em maior abundância neste experimento são compatíveis aos filos descritos na literatura para microbioma cecal de leitões (Gresse et al., 2019). A maior razão Firmicutes/Bacteroidetes para o grupo que recebeu CTC 2g/kg de tanino apresenta correlação com dietas ricas em fibras e com a redução de

diarreia (Middelbos et al., 2010; Molist et al., 2012). O aumento da incidência de *Firmicutes* também pode apresentar correlação negativa com a incidência de bactérias com potenciais patogênicos no intestino de suínos (Mulder et al., 2009). De acordo com o apresentado por Molist et al., (2012), a presença de maior proporção de organismos do filo *Firmicutes* tem o potencial para gerar ambiente intestinal hostil para a colonização por bactérias patogênicas. Resultado semelhante foi encontrado por Diaz Carrasco et al. (2018), no qual aves alimentadas com 1 g/kg de composto de taninos apresentaram uma redução drástica no gênero *Bacteroides* enquanto certos membros da ordem *Clostridiales*, pertencentes principalmente a famílias *Ruminococcacea* e *Lachnospiraceae* foram aumentados. Membros destes grupos têm sido associado à melhora da saúde intestinal e conversão alimentar, sugerindo que eles podem estar associados ao desempenho produtivo das aves.

Dentre os táxons do Filo *Firmicutes*, a maior prevalência dos gêneros *Mitsuokella* e *Acidaminococcus* são associados positivamente a animais com maior consumo alimentar residual (Kubasova et al., 2018). De acordo com estudo descrito por Tan et al. (2018), suínos com menor taxa de conversão alimentar apresentam maior abundância do gênero *Mitsuokella* na microbiota cecal na fase de crescimento. Em conjunto com o gênero *Prevotella*, o gênero *Mitsuokella* apresenta correlação significativa com o peso corporal e ganho de peso diário (Ramayo-Caldas et al., 2016). Ainda, o gênero *Acidaminococcus* é associado à fermentação de aminoácidos lisina, treonina, arginina, glutamato e histidina no intestino delgado de suínos (Dai et al., 2010).

Por outro lado, as bactérias do gênero *Parabacteroides*, observadas em maior incidência nos grupos que não receberam taninos, estão associadas a dietas ricas em amido resistente tipo 4 (Umu et al., 2015), baixo consumo alimentar residual,

juntamente com outras bactérias do filo *Bacteroidetes*, que contribuem para a fermentação de polissacarídeos complexos (Kubasova et al., 2018).

Apesar dos resultados da inclusão de taninos condensados encontrados neste experimento serem iguais aos do controle positivo que fez uso de 2500 ppm de ZnO, o nível de desafio imunológico pode não ter sido suficiente para afirmar-se que ele é uma alternativa ao ZnO.

CONCLUSÃO

A adição de taninos condensados (até 2 g/kg) à dieta de leitões recém desmamados não afetou o desempenho e a digestibilidade aparente do trato total. Houve a presença de fezes mais úmidas nos leitões recebendo as mesmas dietas, porém não a ponto de serem consideradas diarreicas. O desafio proposto não foi suficiente para a modulação da expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4.

Com relação à microbiota, o uso de 2 g/kg de inclusão de taninos condensados, promoveu uma maior razão *Firmicutes/Bacteroidetes*, o que indica modulação benéfica na microbiota gastrointestinal, além de maior incidência dos gêneros *Mitsuokella* e *Acidaminococcus*, associados a melhor desempenho podendo ter efeitos nos períodos subsequentes.

O uso de composto de taninos condensados, sobretudo no nível 2 g/kg, apresentou grandes chances de ser benéfico em situações de desafio intestinal, como é o caso das situações de criação comercial.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
fundação do Ministério da Educação (MEC) pela concessão da bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., Baker, D.L., 2017. Cellular and Molecular Immunology, 9th editio. ed, Cellular and Molecular Immunology. Elsevier.

Arnaiz, V., Ribeiro, A. M., Kessler, A. M., Raber, M., & Kuana, S. (2009). Efecto del peso al destete, temperatura ambiental y energía metabolizable del pienso en lechones recién destetados. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 4(4), 472-478.

Association of Official Analytical Chemists 18th. 2006. Official Methods of Analysis. AOAC, Washington, DC.

Battestin, V. "Sources and uses of tannins and tannases food." *Alimentos e Nutrição* 15.1 (2004): 63-72.

Biagi, G., Cipollini, I., Paulicks, B.R., Roth, F.X., 2010. Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 64, 121–135. <https://doi.org/10.1080/17450390903461584>

Branco, P.A.C.; Lima, J.A.F.; Fialho, E.T. et al. Utilização de farinha pré-gelatinizada de milho e soja micronizada em dietas de leitões dos 21 aos 56 dias de idade. *Boletim de Indústria Animal*, v.63, n.1, p.01-10, 2006.

Brus, M., et al. "Effect of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal microbiota of pigs from 23 to 127 days of age." *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19.4 (2013): 841-847.

Čandek-Potokar, M., Škrlep, M., Lukač, N.B., Zamaratskaia, G., Povše, M. P., Bolta, Š.V., Bee, G., 2015. Hydrolysable tannin fed to entire male pigs affects intestinal production, tissue deposition and hepatic clearance of skatole. *The Veterinary Journal*, 204 (2), 162-167.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity

at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4516–4522.

Diaz Carrasco, J. M., Redondo, E. A., Pin Viso, N. D., Redondo, L. M., Farber, M. D., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2018). Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. *BioMed research international*, 2018.

Degnan, P.H., Ochman, H., 2012. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME J.* 6, 183–194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.74>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA), and European Medicines Agency (EMA). "ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report." *EFSA Journal* 15.7 (2017): e04872.

Frankič, Tamara, and Janez Salobir. "In vivo antioxidant potential of Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract in young growing pigs exposed to n-3 PUFA-induced oxidative stress." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91.8 (2011): 1432-1439.

Girard, M., Thanner, S., Pradervand, N., Hu, D., Ollagnier, C., & Bee, G. (2018). Hydrolysable chestnut tannins for reduction of postweaning diarrhea: Efficacy on an experimental ETEC F4 model. *PLoS One*, 13(5), e0197878.

Girard, M., & Bee, G. (2020). Invited review: Tannins as a potential alternative to antibiotics to prevent coliform diarrhea in weaned pigs. *Animal*, 14(1), 95-107. doi:10.1017/S1751731119002143

Gresse, R., Durand, F.C., Dunière, L., Blanquet-Diot, S., Forano, E., 2019. Microbiota composition and functional profiling throughout the gastrointestinal tract of commercial weaning piglets. *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090343>

Jing, Z.D., Guoyao, Z., 2010. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine 1201–1215. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0556-9>

Kil, D. Y., and H. H. Stein. "Revue commandée par la rédaction: Stratégies d'élevage et d'engraissement pour compenser l'impact du retrait des antibiotiques employés comme facteur de croissance dans la ration des porcelets sevrés." *Canadian Journal of Animal Science* 90.4 (2010): 447-460.

Klasing, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious disease. *Poultry Science*, v 77, p.1119-1125, 1998.

Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Babak, V., Cejkova, D., Montagne, L., Le-Floc'h, N., Rychlik, I., 2018. Effects of host genetics and environmental conditions on fecal microbiota composition of pigs. *PLoS One* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201901>

Lalles, J.P.; Bosi, P.; Smidt, H.; Stokes, C.R. 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutr Soc* 66:260 –268

Liu, H. W., Li, K., Zhao, J. S., & Deng, W. (2018). "Effects of chestnut tannins on intestinal morphology, barrier function, pro-inflammatory cytokine expression, microflora and antioxidant capacity in heat-stressed broilers." *Journal of animal physiology and animal nutrition* 102.3 (2018): 717-726.

Liu, H., Hu, J., Mahfuz, S., Piao, X., 2020. Effects of Hydrolysable Tannins as Zinc Oxide Substitutes on Antioxidant Status, Immune Function, Intestinal Morphology, and Digestive Enzyme Activities in Weaned Piglets. *Animals* 10, 757. <https://doi.org/10.3390/ani10050757>

Marquardt, R.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A., Baidoo, S.K., 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 283–288.

McDougall, G.J.; Gordon, S.; Brennan, R.; Stewart, D. Anthocyanin–Flavanol Condensation Products from Black Currant (*Ribes nigrum* L.), *J. of Agricultural and Food Chemistry* [online], v.53, n.20, p.7878-7885, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0512095>.

Middelbos, I.S., Boler, B.M.V., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S., Fahey, G.C., 2010. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed

Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>

Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., & Callaway, T. R. (2007). Effect of tannins on the in vitro growth of *Escherichia coli* O157: H7 and in vivo growth of generic *Escherichia coli* excreted from steers. *Journal of food protection*, 70(3), 543-550.

Modina, Silvia Clotilde, et al. "Nutritional regulation of gut barrier integrity in weaning piglets." *Animals* 9.12 (2019): 1045.

Molist, F., Manzanilla, E.G., Pérez, J.F., Nyachoti, C.M., 2012. Coarse, but not finely ground, dietary fibre increases intestinal Firmicutes:Bacteroidetes ratio and reduces diarrhoea induced by experimental infection in piglets. *Br. J. Nutr.* 108, 9–15. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005216>

Moreira, I., Rostagno, H. S., Coelho, D. T., COSTA, P. D. A., & Tafuri, M. L. (1994). Determinação dos coeficientes de digestibilidade, valores energéticos e índices de controle de qualidade do milho e soja integral processados a calor. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 23(6), 916-929.

Mulder, I.E., Schmidt, B., Stokes, C.R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R.I., Prosser, J.I., Gill, B.P., Pluske, J.R., Mayer, C.D., Musk, C.C., Kelly, D., 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol.* 7, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-79>

National Research Council (NRC). *Nutrient Requirements of Swine*, 11th ed.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2012.

Nunes, R. V. Fatores antinutricionais dos ingredientes destinados à alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. Anais.Campinas: CBNA, 2001. p. 235-266.

Omanakuttan, M., Konatham, H.R., Dirisala, V.R., Jeevan, A., Mawatwal, S., Dhiman, R., Ly, L.H., McMurray, D., 2020. Prokaryotic Expression, In Vitro Biological Analysis, and In Silico Structural Evaluation of Guinea Pig IL-4. *Mol. Biotechnol.* 62, 104–110. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00227-w>

Park, J. C., Lee, S. H., Hong, J. K., Cho, J. H., Kim, I. H., & Park, S. K. (2014). Effect of dietary supplementation of procyanidin on growth performance and immune response in pigs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(1), 131.

Rodrigues Bonet Quadros, A., Kiefer, C., Dionísio Henn, J., Scariot, G., & Henrique Souza da Silva, J. (2002). DIETAS SIMPLES E COMPLEXA SOBRE O DESEMPENHO DE LEITÕES NA FASE DE CRECHE. *Ci. Rural*.

Pekas, J. C. (1968). Versatile swine laboratory apparatus for physiologic and metabolic studies. *Journal of animal Science*, 27(5), 1303-1306.

Ribeiro, A. M. L., Farina, G., Vieira, M. D. S., Perales, V. A., & Kessler, A. D. M. (2016). Energy utilization of light and heavy weaned piglets subjected to different dietary energy levels. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(9), 532-539

Sakomura, N.K.; Rostagno, H.S. 2016. Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos. 2.ed. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

Sekirov, I.; Russel, S.L.; Antunes, L.C.; Finlay, B.B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90(3):859–904.

Starčević, K., Krstulović, L., Brozić, D., Maurić, M., Stojević, Z., Mikulec, Ž., ... & Mašek, T. (2015). Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1172-1178.

Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Lepage, P., Levenez, F., Denis, C., Lemonnier, G., Leplat, J.J., Billon, Y., Berri, M., Doré, J., Rogel-Gaillard, C., Estellé, J., 2016. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *ISME J.* 10, 2973–2977. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.77>

Reggi, Serena, et al. "In vitro digestion of chestnut and quebracho tannin extracts: Antimicrobial effect, antioxidant capacity and cytomodulatory activity in swine intestinal IPEC-J2 cells." *Animals* 10.2 (2020): 195.

Tan, Z., Wang, Y., Yang, T., Ao, H., Chen, S., Xing, K., Zhang, F., Zhao, X., Liu, J., Wang, C., 2018. Differences in gut microbiota composition in finishing Landrace

pigs with low and high feed conversion ratios. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 1673–1685. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1057-1>

Umu, Ö.C.O., Frank, J.A., Fangel, J.U., Oostindjer, M., Da Silva, C.S., Bolhuis, E.J., Bosch, G., Willats, W.G.T., Pope, P.B., Diep, D.B., 2015. Resistant starch diet induces change in the swine microbiome and a predominance of beneficial bacterial populations. *Microbiome* 3, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0078-5>

Vieira, M. S., Ribeiro, A. M. L., Kessler, A. M., Chiba, L. I., & Bockor, L. (2015). Performance and body composition of light and heavy early-weaning piglets subject to different dietary energy levels. *Livestock Science*, 178, 272-278.

Vieira, M. S., Dadalt, J.C., Ribeiro, A. M. L., Almeida, T.W. (2017). Mannan-oligosaccharides and organic acids for weaned piglets. *Semina: Ciências Agrárias*, 38:2789-2801.

Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* gkt1209.

Wang, Yuxi et al. Sensitivity of *Escherichia coli* to seaweed (*Ascophyllum nodosum*) phlorotannins and terrestrial tannins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 22, n. 2, p. 238-245, 2009.

World Health Organization. "WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals." (2017).

TABELA 1. Composition and nutritional levels of the experimental control diets (g/kg).

Ingredients, g/kg	Pre-starter	Starter
Corn	451.5	448.2
Soybean meal	360.0	373.0
Soybean oil	30.6	40.0
Sugar	30.0	30.0
Whey powder	95.9	47.9
Dicalcium phosphate	12.6	11.3
Limestone	8.5	8.3
Salt	6.5	38.6
Premix Mineral and vitamin ^{1 2}	2.0	1.0
DL-methionine	1.3	1.0
L-lysine HCL	1.2	0.7
Nutrients and energy, % or as shown		
Metabolizable energy (MJ/kg)	14.2	14.0
Crude protein	211.1	209.5
Calcium	8.1	7.5
Phosphorous available	4.3	3.8
Lactose	70.0	35.0
Sodium	3.5	15.6
Lisine	13.5	12.6
Met+Cis	7.4	6.8
Arginine	14.4	14.7
Tryptophan	2.8	2.8
Threonine	8.6	8.5
Choline chloride	13.9	13.6

¹Composição do Premix vitamínico e mineral: Mn,76 mg; Fe, 209 mg; Cu, 150mg; I, 1,75mg; Se, 0,55mg; Co 0,500 mg; Vit.A, 15.000 UI; Vit. D3, 3.500 UI; Vit. E, 100 UI; Vit. K, 7mg; Tiamina, 4mg; Riboflavina, 10 mg; Piridoxina, 5mg; Cianocobalamina, 45 mg; Ác. nicotínico, 50 mg; Ác. Pantotênico, 30 mg; Ác. Fólico, 4,5mg; Biotina, 0,5mg; Colina 780mg; antioxidante 100mg. ² Houve Foram utilizados dois premixes, sendo que a diferença foi somente entre os níveis de Zn 2.500mg e 80mg.

TABELA 2 – Average body weight (BW kg), average feed intake (AFI g day⁻¹), average weight gain (WG g day⁻¹) and feed conversion ratio (FCR: feed intake/weight gain) of piglets in the pre-starter period (1-14 days), initial period (15-28 days) and total period (1-28 days) receiving condensed tannins compost (CTC) or supplemented ZnO.

1-14 days	Control		CTC		SEM ¹	P-value
	Negative	Positive	0,1 g/kg	0,2 g/kg		
WG (g/dia)	276	266	278	275	0,0069	0,89
FI (g/dia)	366	366	385	383	0,0095	0,463
FCR(FI/WG)	1,32	1,38	1,39	1,40	0,0228	0,599
BW 14 (kg)	10,29	10	10	10.6	0,242	0,872
15-28 days						
WG (g/dia)	444	465	459	482	0,0161	0.87
FI (g/dia)	629	674	645	699	0,022	0.689
BW 28 (kg)	16,1	16,2	16,4	17.2	0,428	0,838
FCR(FI/WG)	1,42	1,46	1,41	1,46	0,0269	0,852
1-28 days						
BW initial (kg)	6.2	6.2	6.3	6.3	0,0197	0.999
WG (g/dia)	354	388	368	378	0,0106	0.722
FI (g/dia)	489	547	515	540	0,0151	0.54
FCR(FI/WG)	1,38	1,41	1,40	1,42	0,0208	0,797
BW final (kg)	16,1	17,3	16,4	17,1	0,4109	0.718

¹ Standard error of mean. ^{a,b,c}Values with different superscripts in the same row differ significantly at $P < 0.05$.

TABELA 3 – Apparent total tract digestibility (ATTD) of dry matter (DM), gross energy (GE), crude protein (CP) and coefficient of nitrogen retention (NR) and metabolisability of gross energy (MGE) of the pre-initial and initial diets.

7-14 days	Control		CTC		SEM ¹	P-value ²
	Negative	Positive	0,1 g/kg	0,2 g/kg		
DM	0.731	0.700	0.749	0.750	1,12	0,396
GE	0.726	0.686	0.734	0.733	1,13	0,418
CP	0.692	0.685	0.673	0.666	1,38	0,918
NR	0.558	0.533	0.505	0.543	1,65	0,747
MGE	0.707	0.664	0.711	0.715	1,15	0,411
21- 28 days						
DM	0.756	0.783	0.810	0.803	1,11	0,384
GE	0.758	0.786	0.805	0.799	1,12	0,542
CP	0.712	0.741	0.756	0.747	1,47	0,806
NR	0.550	0.560	0.563	0.552	1,22	0,981
GEM	0.738	0.764	0.785	0.780	1,1	0,514

¹ Standard error of mean. ^{a,b,c}Values with different superscripts in the same row differ significantly at $P < 0.05$.

TABELA 4 - Average fecal score¹ in the pre-initial period (1 to 14 days), initial (15 to 28 days) and total (1 to 28 days) of piglets receiving condensed tannins compost (CTC) or supplemented ZnO.

	Average fecal score			
	Control		CTC	
	Negative	Positive	1 g/kg	2 g/kg
1-14 days	1,8 b	1,85 b	2,44 a	2,66 a
15-28 days	1,99 b	1,97 b	2,28 a	2,32 a
1-28 days	1,89 b	1,90 b	2,36 a	2,49 a
SEM¹	0,0343	0,0351	0,057	0,0549

¹ Standard deviation. ^{a,b,c} means followed by letters differ from each other in the same column by

$P < 0.001$

TABELA 5 – Firmicutes/Bacteroidetes rate in the cecal content of piglets receiving condensed tannins compost (CTC) or supplemented ZnO.

	Control		CTC	
	Negative	Positive	1 g/kg	2 g/kg
Average	0.747 a	0.777 ab	1.099 ab	2.444b
St. Error mean	0,0625	0,0525	0,0625	0,3162
Sampling error				
Standard	0.125	0.104	0.127	0.632

¹ Standard error of mean. Values with different superscripts in the same row differ significantly at $P < 0.05$.

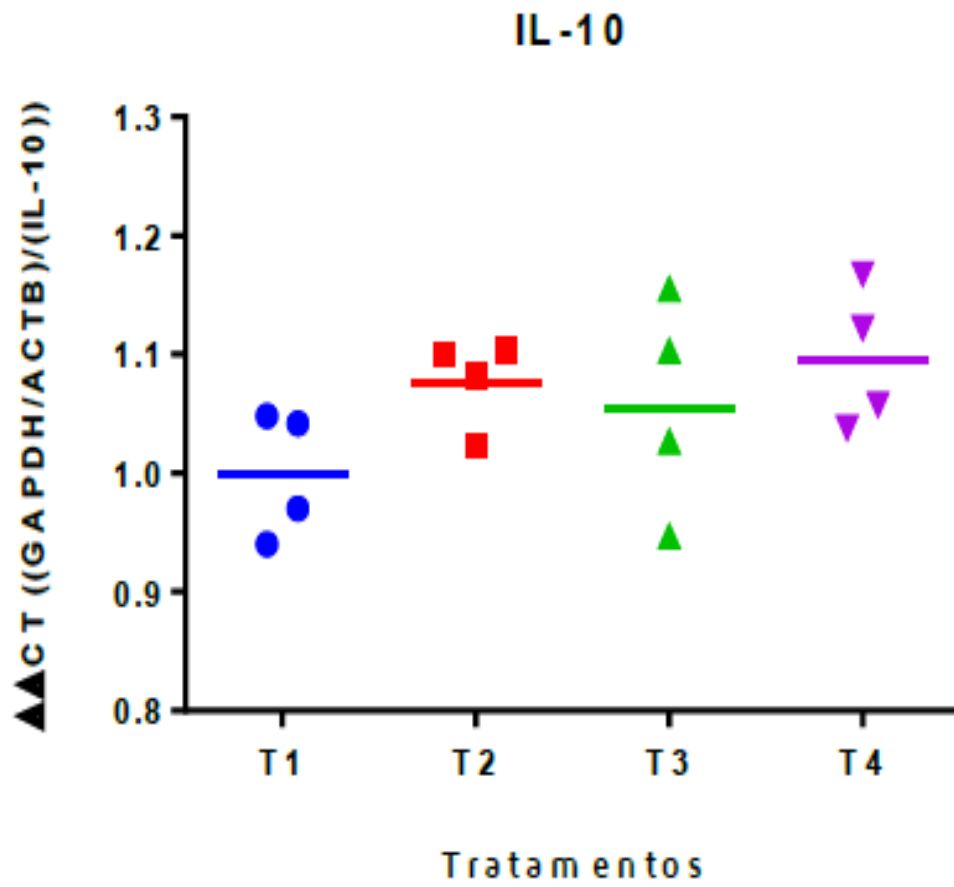


Figura 3. Expressão relativa de IL-10 em relação ao grupo referência (GAPDH).

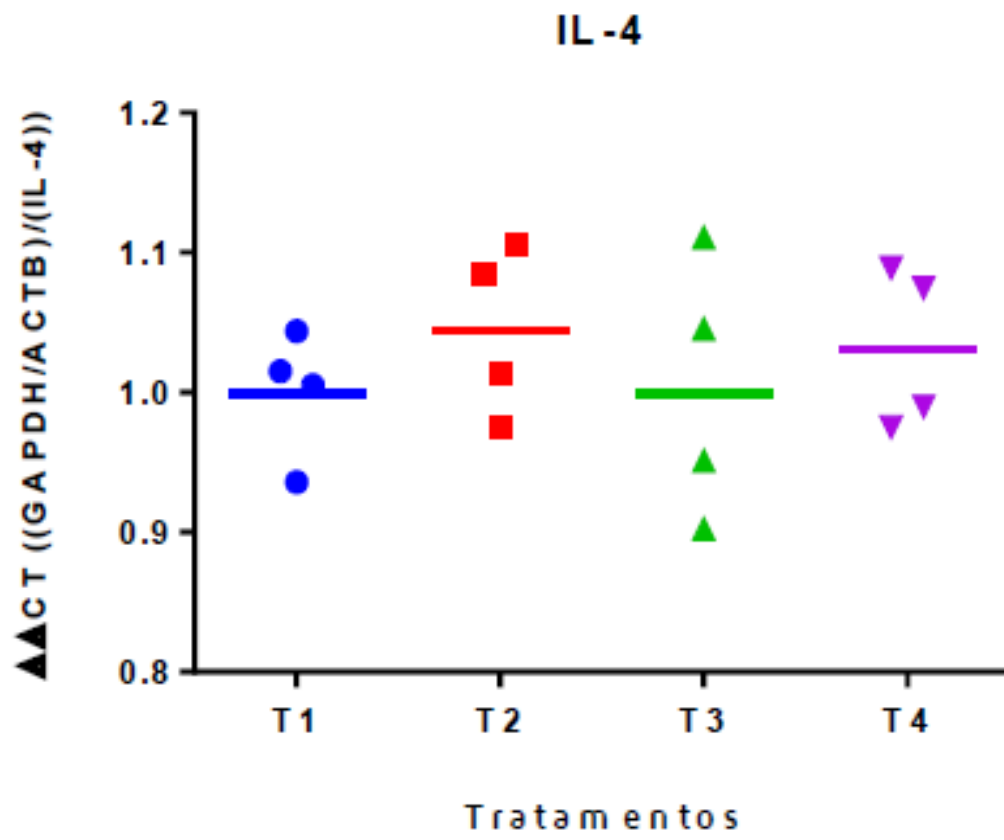


Figura 4. Expressão relativa de IL-4 em relação ao grupo referência (GAPDH).

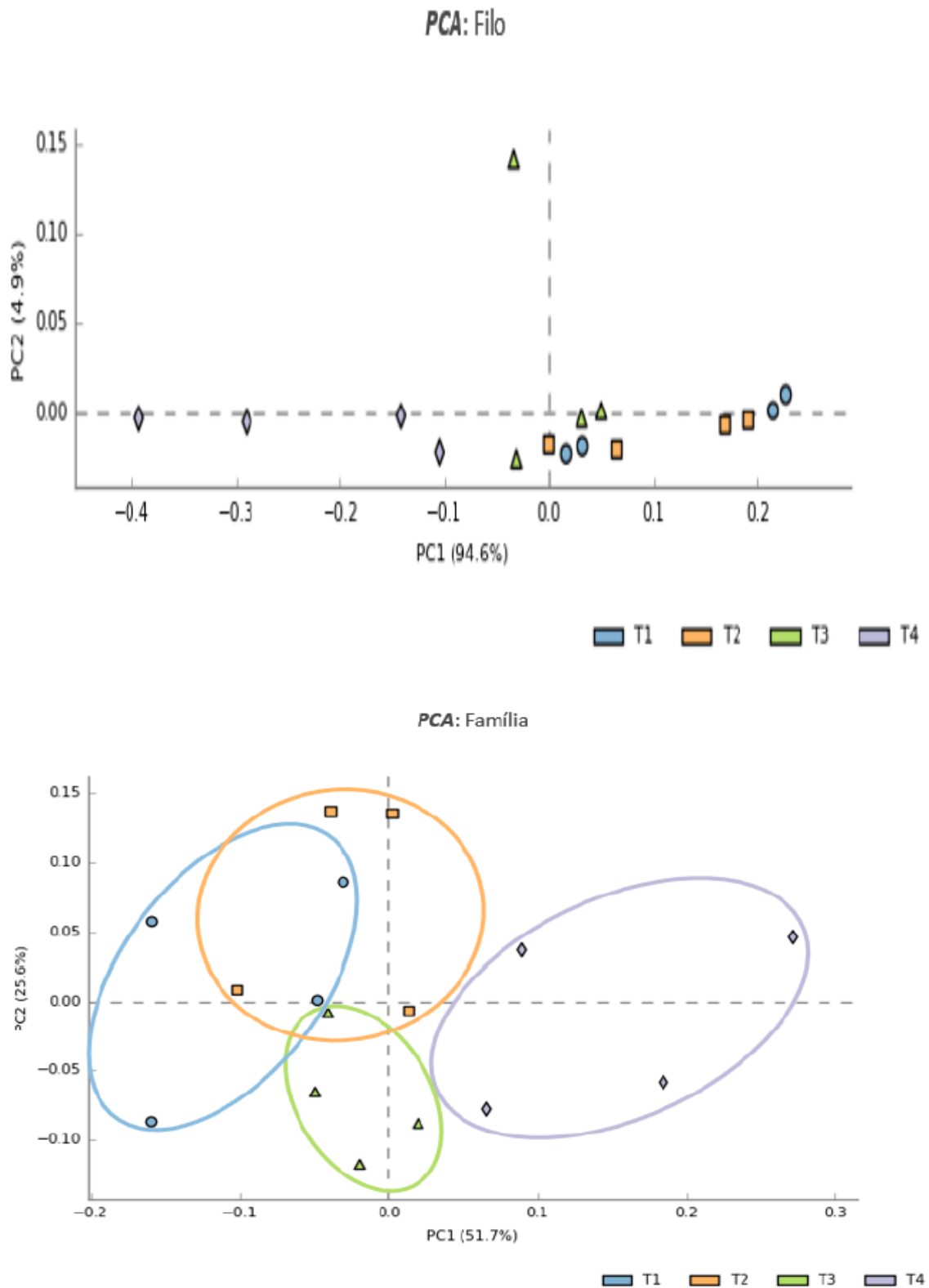


Figura 5. A análise de componente principal (PCA) obtida com os dados de filo (acima) e família (abaixo).

Os pontos representam os animais. Pontos próximos têm alta similaridade quanto à sua microbiota.

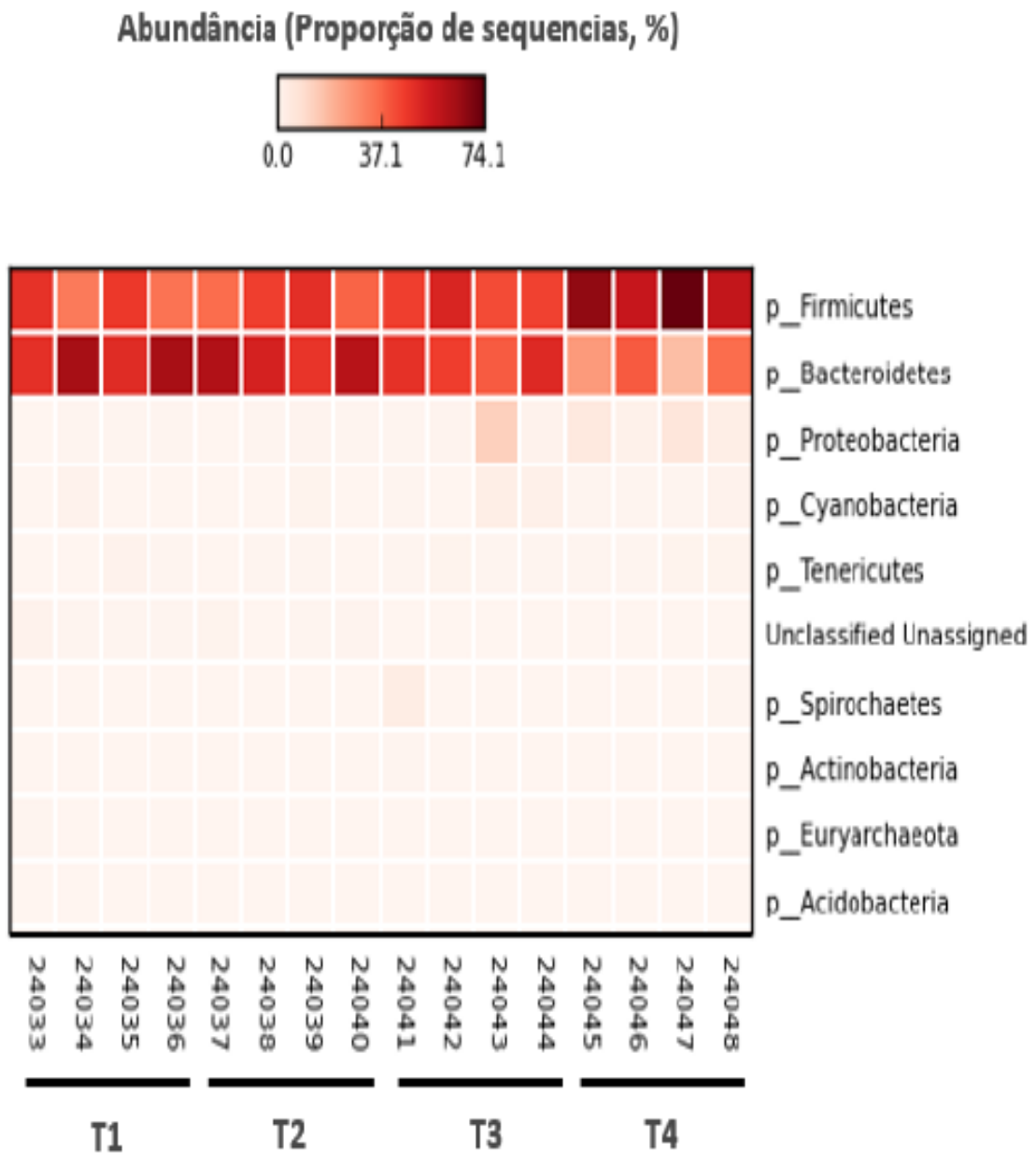


Figura 6. Heatmap. Abundância dos principais filos bacterianos e de Archaea presentes nas amostras analisadas.

Quanto maior a intensidade da cor vermelha, maior a abundância percentual do filo, no eixo vertical direito. 'Unclassified/unassigned' representa porcentagem de OTUs cuja sequência não encontrou correlação com organismos descritos na literatura e banco de dados.

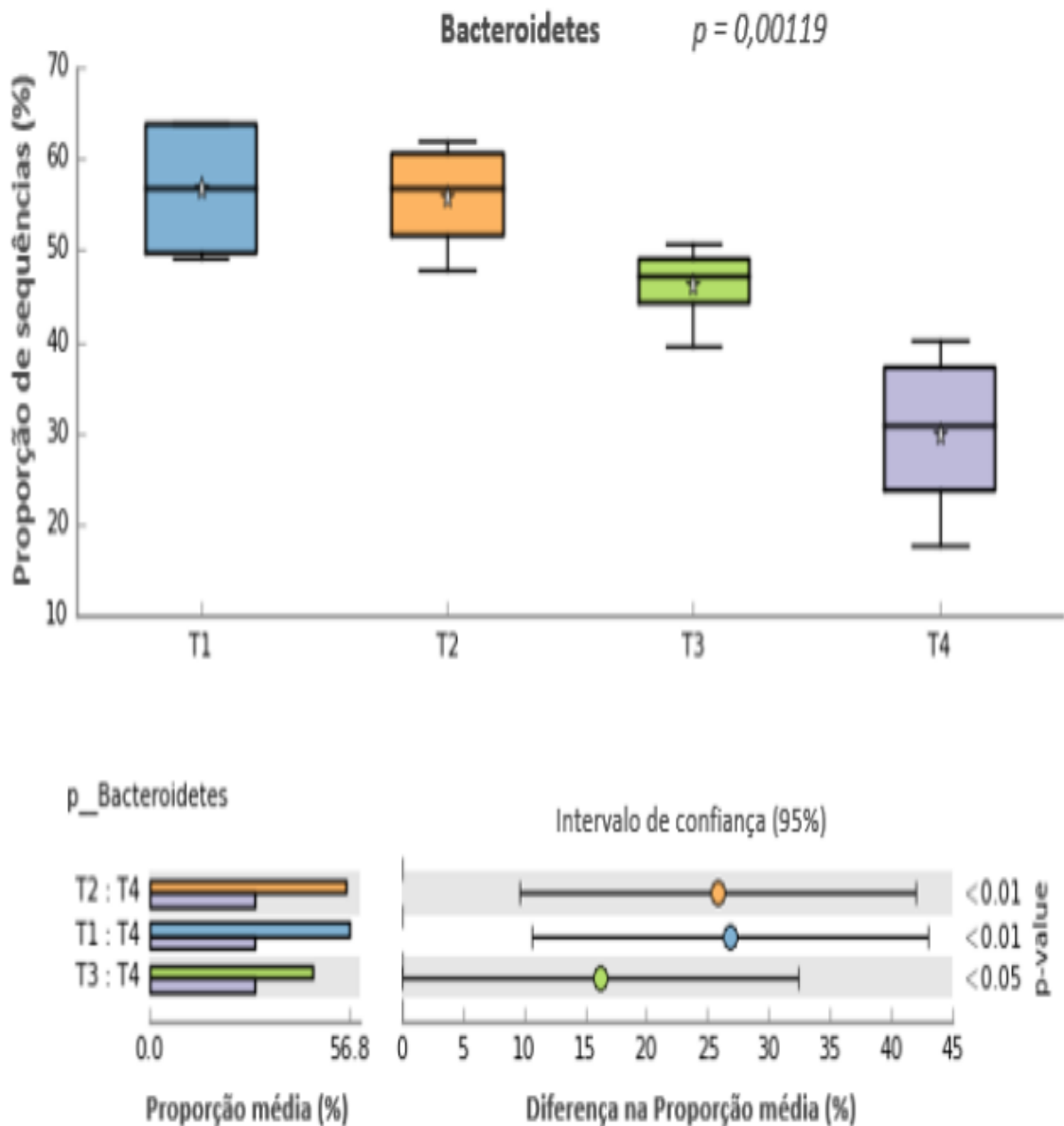


Figura 7. Distribuição das proporções do filo Bacteroidetes nos diferentes grupos.

Os diagramas em caixa representam a mediana das amostras como uma linha, a média como uma estrela, o 25º e o 75º percentis como as linhas superior e inferior da caixa. As barras indicam os pontos de dados mais extremo dentro de $1,5 * (75^\circ - 25^\circ \text{ percentil})$ da mediana. Os pontos de dados fora das barras são mostrados como '+'. As diferenças indicadas abaixo de cada gráfico, foram calculadas por ANOVA ($P < 0.05$), com teste post hoc Tukey-Kramer ($P < 0.05$) com correção pelo teste de comparações múltiplas Benjamini-Hochberg FDR.

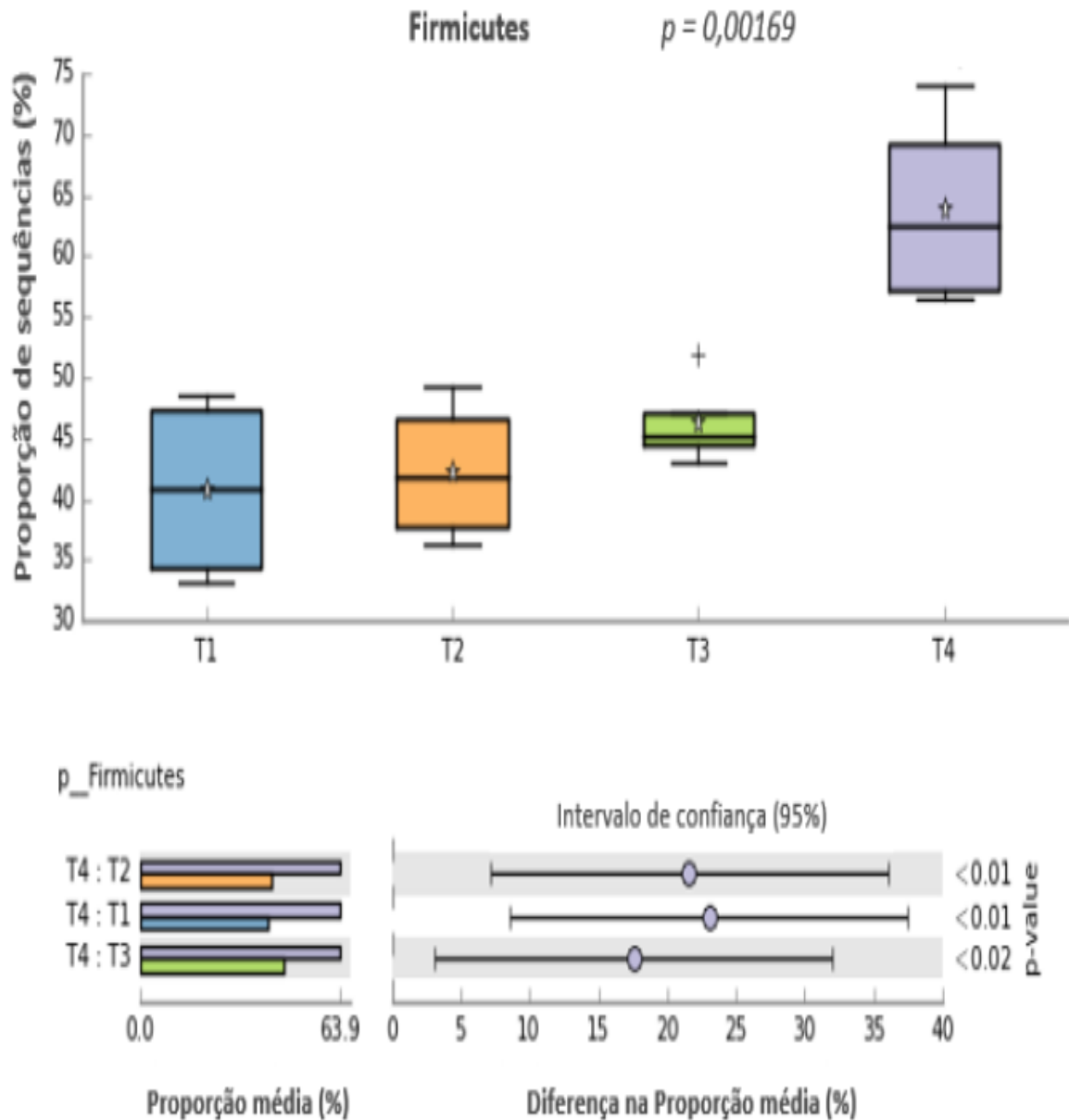


Figura 8. Distribuição das proporções do filo Firmicutes nos diferentes grupos.

Os diagramas em caixa representam a mediana das amostras como uma linha, a média como uma estrela, o 25º e o 75º percentis como as linhas superior e inferior da caixa. As barras indicam os pontos de dados mais extremo dentro de $1,5 * (75^\circ - 25^\circ \text{ percentil})$ da mediana. Os pontos de dados fora das barras são mostrados como '+'. As diferenças indicadas abaixo de cada gráfico, foram calculadas por ANOVA ($p < 0.05$), com teste post hoc Tukey-Kramer ($p < 0.05$) com correção pelo teste de comparações múltiplas Benjamini-Hochberg FDR.

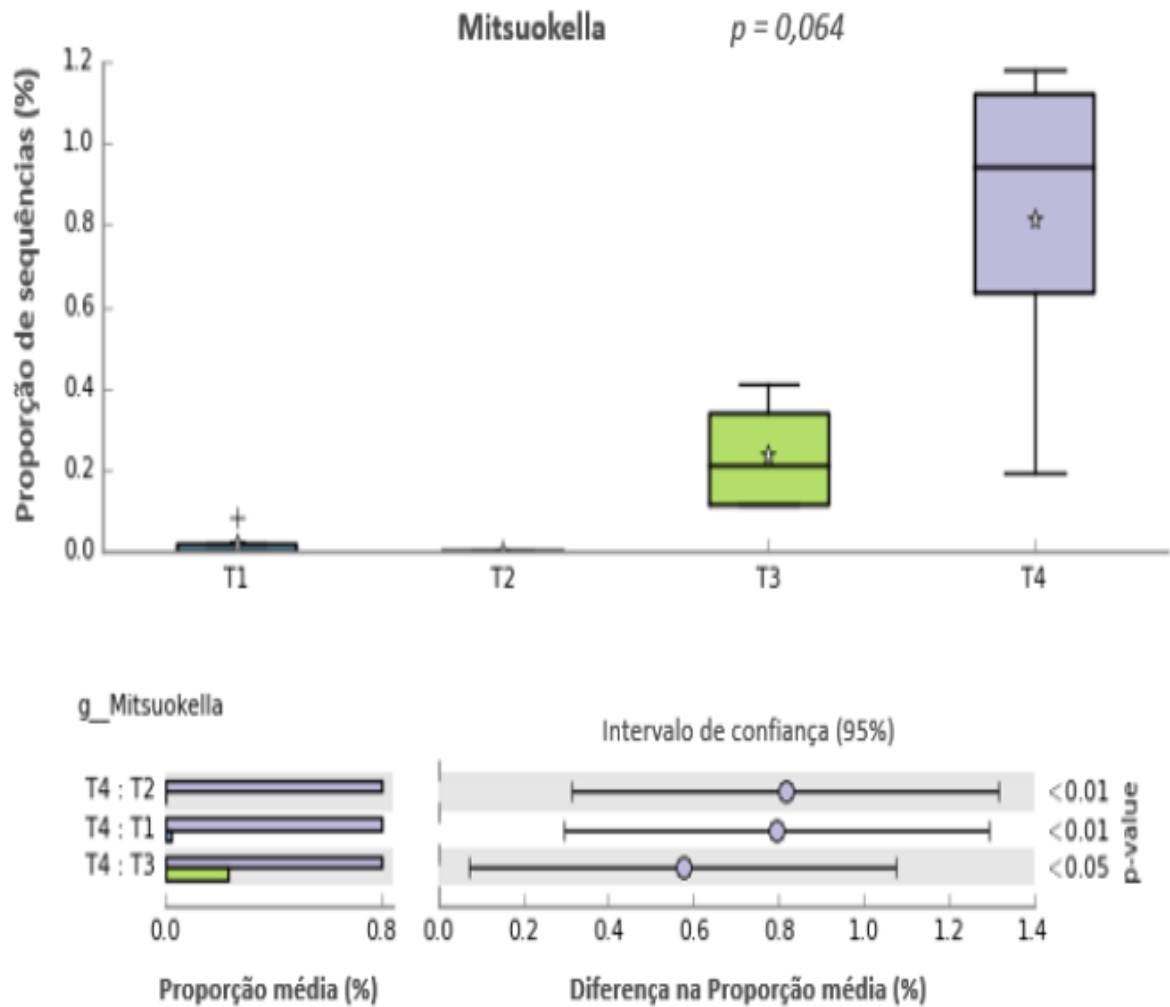


Figura 9. Distribuição das proporções do gênero Mitsuokella nos diferentes grupos.

Os diagramas em caixa representam a mediana das amostras como uma linha, a média como uma estrela, o 25º e o 75º percentis como as linhas superior e inferior da caixa. As barras indicam os pontos de dados mais extremo dentro de $1,5 * (75^\circ - 25^\circ \text{ percentil})$ da mediana. Os pontos de dados fora das barras são mostrados como '+'. As diferenças indicadas abaixo de cada gráfico, foram calculadas por ANOVA ($P < 0.05$), com teste post hoc Tukey-Kramer ($P < 0.05$) com correção pelo teste de comparações múltiplas Benjamini-Hochberg FDR.

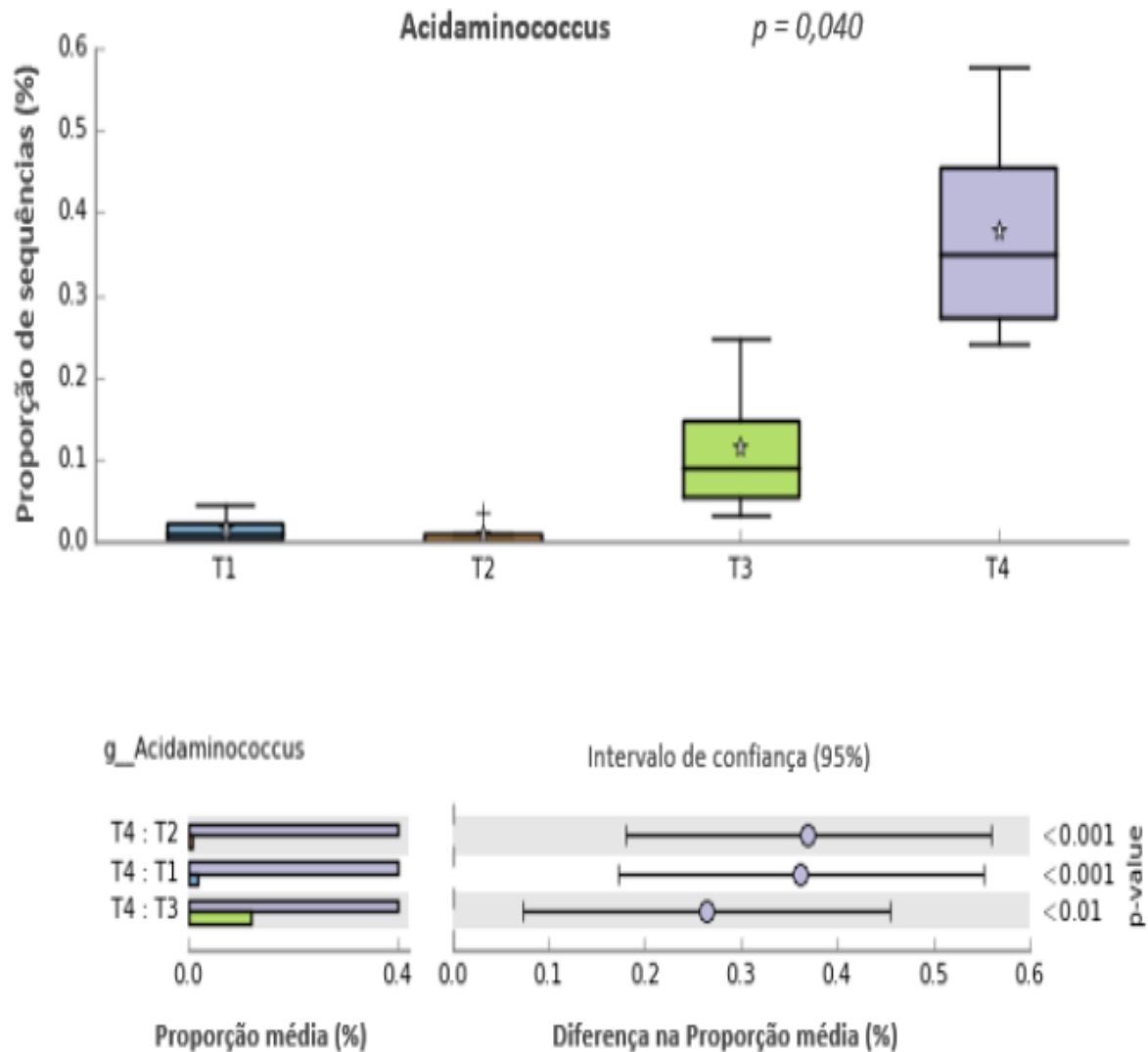


Figura 10. Distribuição das proporções do gênero *Acidaminococcus* nos diferentes grupos.

Os diagramas em caixa representam a mediana das amostras como uma linha, a média como uma estrela, o 25º e o 75º percentis como as linhas superior e inferior da caixa. As barras indicam os pontos de dados mais extremo dentro de $1,5 * (75^\circ - 25^\circ \text{ percentil})$ da mediana. Os pontos de dados fora das barras são mostrados como '+'. As diferenças indicadas abaixo de cada gráfico, foram calculadas por ANOVA ($P < 0.05$), com teste post hoc Tukey-Kramer ($P < 0.05$) com correção pelo teste de comparações múltiplas Benjamini-Hochberg FDR.

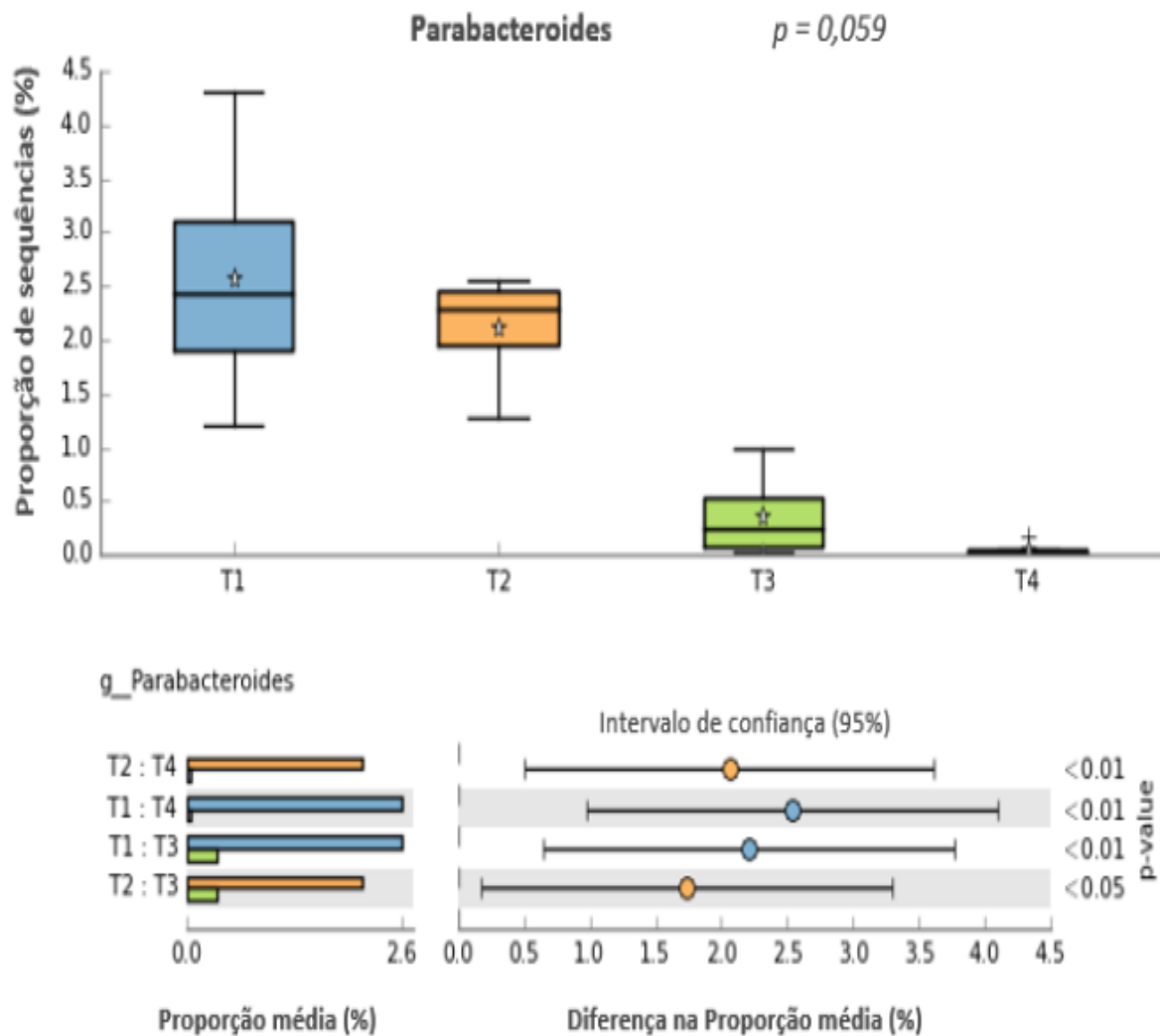


Figura 11. Distribuição das proporções do gênero Parabacteroides nos diferentes grupos.

Os diagramas em caixa representam a mediana das amostras como uma linha, a média como uma estrela, o 25º e o 75º percentis como as linhas superior e inferior da caixa. As barras indicam os pontos de dados mais extremo dentro de $1,5 * (75^\circ - 25^\circ \text{ percentil})$ da mediana. Os pontos de dados fora das barras são mostrados como '+'. As diferenças indicadas abaixo de cada gráfico, foram calculadas por ANOVA ($P < 0.05$), com teste post hoc Tukey-Kramer ($P < 0.05$) com correção pelo teste de comparações múltiplas Benjamini-Hochberg FDR.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados evidenciam que o uso de composto de taninos condensados apresenta propriedades que podem interessar a produção animal, no entanto, ainda é preciso estudar suas interações com outros aditivos para que se tenha um melhor conhecimento, bem como, aplicar o produto em caso de desafios diferentes do desafio proposto nesse experimento, que foi baseado em dietas simples, com alto teor de farelo de soja. Este estudo também demonstrou que a adição de taninos, nos níveis propostos, ao contrário do esperado não afetou a palatabilidade da dieta. Também não afetou de maneira negativa o desempenho dos animais, o que seria esperado devido aos diversos fatores antinutricionais associado aos taninos. Os resultados encontrados demonstram que os taninos condensados podem ser uma alternativa viável como aditivo na alimentação de suínos na fase de creche, uma vez que os resultados mostraram que não houve diminuição do consumo, mas houve a modulação da microbiota de maneira favorável de forma que esta modulação pode influenciar o desempenho nas fases subsequentes.

Os dados de digestibilidade foram inconclusivos devido à grande variação entre as repetições. Experimentos de digestibilidade com leitões muito jovens e dietas pouco adequadas à idade têm se mostrado difíceis de conduzir. Qualquer evento de diarreia pode alterar a digestibilidade da dieta e, desta forma, alterar os resultados finais. Também é importante salientar os taninos condensados tiveram efeitos semelhante as dietas com 2500 ppm de óxido de zinco, no entanto não podemos afirmar se ele teria o mesmo resultado com um desafio imunológico maior, é necessário maiores investigações.

Outro fator importante a ser comentado é que este experimento ocorreu durante o segundo semestre de 2020, durante a pandemia do COVID-19, o que exigiu um grande esforço de todas as partes envolvidas. A influência da pandemia afetou desde a obtenção de insumos, transporte dos animais, e claro a logística para realização do experimento de forma a garantir o menor número de pessoas expostas a riscos e garantindo todas as normas de segurança, além de garantir a segurança dos animais.

O aumento de todos os custos para realização do projeto, principalmente das análises laboratoriais e as restrições devido as medidas de “lockdown” impostas pela pandemia, também restringiu a quantidade de análises, o que limitou os resultados

do experimento. Porém considero importante o resultado obtido, e agradeço o enorme empenho de todos os envolvidos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2014.

ARNAIZ, V. *et al.* Efecto del peso al destete, temperatura ambiental y energía metabolizable del pienso en lechones recién destetados. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 4, p. 472-478, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington, Va: The Association, 1925.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BEDNORZ, C. *et al.* The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli in vivo*. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 303, n. 6/7, p. 396-403, 2013.

BEELEN, P. M. G.; PEREIRA FILHO, J. M.; BEELEN, R. N. Avaliação de taninos condensados em plantas forrageiras. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 18.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 10., 2008, João Pessoa. **Anais [...]**. João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnia; Embrapa Caprinos; UFPB, 2008. 15 f.

BHAT, Tej K.; SINGH, Bhupinder; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins—a current perspective. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 9, n. 5, p. 343-357, 1998.

BIAGI, G. *et al.* Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 64, n. 2, p. 121-135, 2010.

BLIKSLAGER, A. T. *et al.* Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, n. 2, p. 545-564, 2007.

BOREWICZ, K. A. *et al.* Changes in the porcine intestinal microbiome in response to infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. **PloS One**, San Francisco, v. 10, n. 10, [art.] e0139106, 2015.

BOTELHO, Fábio Guilherme Autran. **O zinco como promotor do crescimento de suínos em recria**. 1996. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

BRANCO, P. D. A. C. *et al.* Utilização da farinha pré-gelatinizada de milho e soja micronizada em dietas de leitões dos 21 aos 56 dias de idade. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 63, n. 1, p. 1-10, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 3 de 15 de janeiro de 2020. **Diário Oficial da União: seção 1**, Brasília, DF, v. 203, n. 1, p. 6, 17 jan. 2020.

BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Washington, DC, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROOM, L. J. *et al.* Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. **Research in Veterinary Science**, London, v. 80, n. 1, p. 45-54, 2006.

BRUS, M. *et al.* Effect of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal microbiota of pigs from 23 to 127 days of age. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 19, n. 4, p. 841-847, 2013.

ČANDEK-POTOKAR, M. *et al.* Hydrolysable tannin fed to entire male pigs affects intestinal production, tissue deposition and hepatic clearance of skatole. **The Veterinary Journal**, London, v. 204, n. 2, p. 162-167, 2015.

CANNAS, Antonello. Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules. **Cornell University**, [Ithaca], 28 Feb. 2019. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin>. Html. Acesso em: 14 mar. 2019.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CAPORASO, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 108, p. 4516-4522, 2011. Supl. 1.

CARVALHO, Wilson Andrade; LEMÔNICA, Lino. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 137-158, 2020.

CELI, P. *et al.* Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 234, p. 88-100, 2017.

CHENG, G. *et al.* Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, [art.] 217, 2014.

CLAUS, R.; GÜNTNER, D.; LETZGUSS, H. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 91, n. 7/8, p. 312-318, 2007.

CLEMENTE, J. C. O impacto da microbiota intestinal na saúde humana: uma visão integrativa. **Cell**, Cambridge, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

COSTA, G. *et al.* Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 3, p. 376-387, 2008.

COSTA, L. B.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 589-595, 2007.

CRISTANI, J. *et al.* Níveis de Zn nos tecidos e fezes de leitões suplementados com 2400 ppm de Zn para o controle da diarreia pós desmame. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DA ABRAVES, 8., 1997, Foz do Iguaçu. **Anais [...]**. Foz do Iguaçu: ABRAVES, 1997. p. 243-244.

DAI, Z. L. *et al.* Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine. **Amino Acids**, Wien, v. 39, n. 5, p. 1201-1215, 2010.

DEBSKI, B. Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 19, n. 4, p. 917-924, 2016.

DEGNAN, P. H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 1, p. 183-194, 2012.

DIAZ CARRASCO, J. M. *et al.* Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. **BioMed Research International**, New York, v. 2018, [art.] ID 1879168, 2018.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

EUROPEAN FEED SECURITY AGENCY (EFSA). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. **EFSA Journal**, Parma, v. 15, n. 7, [art.] 4872, 2017.

FIALHO, E. T.; BARBOSA, H. P. **Utilização de sorgo em rações para suínos e aves**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1992. 19 p. (Circular Técnica, 16).

FRANKIČ, T.; SALOBIR, J. In vivo antioxidant potential of Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract in young growing pigs exposed to n-3 PUFA-induced oxidative stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 8, p. 1432-1439, 2011.

FRUTOS, P. *et al.* Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? **Animal Research**, Cambridge, v. 53, n. 2, p. 127-136, 2004.

- GIRARD, M.; BEE, G. Invited review: Tannins as a potential alternative to antibiotics to prevent coliform diarrhea in weaned pigs. **Animal**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 95-107, 2020.
- GIRARD, M. *et al.* Hydrolysable chestnut tannins for reduction of postweaning diarrhea: efficacy on an experimental ETEC F4 model. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 5, [e0197878], 2018.
- GRESSE, R. *et al.* Microbiota composition and functional profiling throughout the gastrointestinal tract of commercial weaning piglets. **Microorganisms**, Basel, v. 7, n. 9, [art.] 343, 2019.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, New York, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, n. 9, p. 4494-4497, 1981.
- HAGERMAN, A. E. *et al.* High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 46, n. 5, p. 1887-1892, 1998.
- HOLMAN, D. B.; CHÉNIER, M. R. Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 61, n. 11, p. 785-798, 2015.
- HÖLZEL, C. S. *et al.* Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. **Environmental Research**, Amsterdam, v. 113, p. 21-27, 2012.
- HUISMAN, J.; TOLMAN, G. H. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. *In*: GARNSWORTHY, P. C.; HARESIGN, W.; COLE, D. J. A. (ed.). **Recent advances in animal nutrition**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 2-31.
- ISAACSON, R.; KIM, H. B. The intestinal microbiome of the pig. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 13, n. 1, p. 100-109, 2012.
- JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.
- KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, London, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.
- KIL, D. Y.; STEIN, H. H. Revue commandée par la rédaction: stratégies d'élevage et d'engraissement pour compenser l'impact du retrait des antibiotiques employé s comme facteur de croissance dans la ration des porcelets sevrés. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 90, n. 4, p. 447-460, 2010.

KIM, G. B. *et al.* Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 75-82, 2011.

KIM, J. C. *et al.* Nutrition and pathology of weaner pigs: nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, n. 1/2, p. 3-16, 2012.

KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, n. 8, p. 1119-1125, 1998.

KUBASOVA, T. *et al.* Effects of host genetics and environmental conditions on fecal microbiota composition of pigs. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 8, [art.] e0201901, 2018.

KUBENA J. A. *et al.* Effects of tannic acid on cecal volatile fatty acids and susceptibility to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1293-1297, 2001.

KUMMER, R. *et al.* Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 195-209, 2009.

LALLES, J. P. *et al.* Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, Wallingford, v. 66, n. 2, p. 260-268, 2007.

LAMENDELLA, R. *et al.* Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. **BMC Microbiology**, London, v. 11, [art.] 103, [p. 1-17], 2011.

LESER, T. D. *et al.* Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 2, p. 673-690, 2002.

LEWIS, Norman G.; YAMAMOTO, Etsuo. Tannins—their place in plant metabolism. *In*: HEMINGWAY, Richard W.; KARCHESY, Joseph J. **Chemistry and significance of condensed tannins**. Boston: Springer, 1989. p. 23-46.

LEY, R. E. *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, Washington, DC, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008.

LIMA, G. J. M. M. *et al.* Efeito do uso de diferentes fontes de óxido de zinco em dietas de leitões após o desmame. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais [...]**. Fortaleza: SBZ, 1996. p. 177-181.

LIMA, G. J. M. M.; MORÉS, N.; SANCHES, R. L. As diarreias nutricionais na suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, p. s17-s30, 2009. Supl. 1.

- LIU, H. *et al.* Effects of hydrolysable tannins as zinc oxide substitutes on antioxidant status, immune function, intestinal morphology, and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Animals**, Basel, v. 10, n. 5, [art.] 757, 2020.
- LIU, H. W. *et al.* Effects of chestnut tannins on intestinal morphology, barrier function, pro-inflammatory cytokine expression, microflora and antioxidant capacity in heat-stressed broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 3, p. 717-726, 2018.
- LOOFT, T. *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 109, n. 5, p. 1691-1696, 2012.
- LOOFT, T. *et al.* Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 8, p. 1566-1576, 2014.
- MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MARIN, D. E.; TARANU, I.; GROSU, H. Microorganisms involved in the decontamination of trichotecens, mycotoxins produced by Fusarium fungi. **Archiva Zootechnica**, Bucharest, v. 14, n. 4, p. 5-24, 2011.
- MARQUARDT, R. R. *et al.* Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Chichester, v. 23, n. 4, p. 283-288, 1999.
- MCDOUGALL, G. J. *et al.* Anthocyanin– flavanol condensation products from black currant (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 20, p. 7878-7885, 2005.
- MELLOR, Sarah. Alternatives to antibiotic. **Pig Progress**, Doetinchem, v. 16, n. 4, p. 18-21, 2000.
- MIDDELBOSS, Ingmar S. *et al.* Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PloS One**, San Francisco, v. 5, n. 3, [art.] e9768, 2010.
- MIN, B. R. *et al.* Effect of tannins on the in vitro growth of *Escherichia coli* O157: H7 and in vivo growth of generic *Escherichia coli* excreted from steers. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 3, p. 543-550, 2007.
- MODINA, S. C. *et al.* Nutritional regulation of gut barrier integrity in weaning piglets. **Animals**, Basel, v. 9, n. 12, [art.] 1045, 2019.
- MOLINA, Lívio Ribeiro *et al.* Parâmetros de degradabilidade potencial da matéria seca e da proteína bruta das silagens de seis genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor*

(L.) Moench), com e sem tanino no grão, avaliados pela técnica *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 1, p. 222-228, 2003.

MOLIST, F. *et al.* Coarse, but not finely ground, dietary fibre increases intestinal *Firmicutes: bacteroidetes* ratio and reduces diarrhoea induced by experimental infection in piglets. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 108, n. 1, p. 9-15, 2012.

MOLLY, Koen. Formulation to solve the intestinal puzzle. **Pig Progress**, Doetinchem, v. 17, p. 20-22, 2001.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, I. *et al.* Determinação dos coeficientes de digestibilidade, valores energéticos e índices de controle de qualidade do milho e soja integral processados a calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 23, n. 6, p. 916-929, 1994.

MORI, A. V. *et al.* Les enzymes modifient la physiologie intestinale chez le porcelet. **Journées de la Recherche Porcine en France**, Paris, v. 39, p. 139-142, 2007.

MULDER, I. E. *et al.* Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. **BMC Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 1-20, 2009.

MUELLER-HARVEY, I.; MCALLAN, A. B. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. **Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology**, London, v. 1, n. 1, p. 151-217, 1992.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, n. 86, p. 2010-2037, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of swine**. 11th ed. Washington, DC: National Academies Press, 2012.

NUNES, R. V. *et al.* Fatores antinutricionais dos ingredientes destinados à alimentação animal. *In*: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: CBNA, 2001. p. 235-272.

OETTING, L. L. *et al.* Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1389-1397, 2006.

OMANAKUTTAN, M. *et al.* Prokaryotic expression, in vitro biological analysis, and in silico structural evaluation of guinea pig IL-4. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 62, n. 2, p. 104-110, 2020.

PAJARILLO, E. A. B. *et al.* Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. **Journal of Microbiology**, Heidelberg, v. 52, n. 8, p. 646-651, 2014.

PARK, J. C. *et al.* Effect of dietary supplementation of procyanidin on growth performance and immune response in pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 27, n. 1, p. 131-139, 2014.

PASCOAL, L. A. F.; SILVA, L. D. P. G. D. Adição de enzimas exógenas nas dietas de leitões desmamados. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 2, n. 6, p. 273-283, 2005.

PLUSKE, J. R. Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig. *In*: PIVA, A.; KNUDSEN, K. E. B.; LINDBERG, J. E. **Gut environment of pigs**. Nottingham: University Press, 2001. p. 1-27.

QUADROS, A. R. B. *et al.* Dietas simples e complexa sobre o desempenho de leitões na fase de creche. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 109-114, 2002.

RAMAYO-CALDAS, Y. *et al.* Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. **The ISME Journal**, London, v. 10, n. 12, p. 2973-2977, 2016.

REGGI, S. *et al.* In vitro digestion of chestnut and quebracho tannin extracts: antimicrobial effect, antioxidant capacity and cytomodulatory activity in swine intestinal IPEC-J2 cells. **Animals**, Basel, v. 10, n. 2, [art.] 195, 2020.

RIBEIRO, A. M. L. *et al.* Energy utilization of light and heavy weaned piglets subjected to different dietary energy levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 45, n. 9, p. 532-539, 2016.

ROCA, M. *et al.* Changes in bacterial population of gastrointestinal tract of weaned pigs fed with different additives. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, [art.] 269402, 2014.

ROSELLI, M. *et al.* Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, n. 12, p. 4077-4082, 2003.

ROSTAGNO, H. S.; PUPA, J. M. R. Fisiologia da digestão e alimentação de leitões. *In*: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E MANEJO DE LEITÕES, 1998, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: CBNA, 1998. p. 60-87.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2016.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 1094- 1117, 2000.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, Barking, v.101, n. 2, p. 492–501, 2007.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, Paris, v. 32, n. 3/4, p. 201-225, 2001.

SEKIROV, I. *et al.* Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

SERRANO, J. *et al.* Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 53, p. S310-S329, 2009. Supl. 2.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações e modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SHURSON, J.; JOHNSTON, L. Swine nutrition and health connections. 1998. *In*: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1998, [Minneapolis]. **Papers** [...]. [Minneapolis]: University of Minnesota, 1998. p. 77-95.

SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H. **Plant phenolics in toxicants occurring naturally in foods**. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1973.

SOARES, S.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. **Food Research International**, New York, v. 49, n. 2, p. 807-813, 2012.

SOMMER, F. *et al.* The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 15, n. 10, p. 630-638, 2017.

STARCEVIC, K. *et al.* Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 95, n. 6, p. 1172-1178, 2015.

TAN, Z. *et al.* Differences in gut microbiota composition in finishing Landrace pigs with low and high feed conversion ratios. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 111, n. 9, p. 1673-1685, 2018.

UMU, Ö. C. *et al.* Resistant starch diet induces change in the swine microbiome and a predominance of beneficial bacterial populations. **Microbiome**, London, v. 3, [art.] 16, [p. 1-15], 2015.

VIEIRA, M. S. *et al.* Performance and body composition of light and heavy early-weaning piglets subject to different dietary energy levels. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 178, p. 272-278, 2015.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Ácidos orgânicos e suas misturas em dietas de suínos. *In*: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. [**Anais ...**]. Campinas: CBNA, 2003. v. 2, p. 153-182.

WANG, Y. *et al.* Sensitivity of *Escherichia coli* to seaweed (*Ascophyllum nodosum*) phlorotannins and terrestrial tannins. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 22, n. 2, p. 238-245, 2009.

WANG, M. *et al.* Tannic acid modulates intestinal barrier functions associated with intestinal morphology, antioxidative activity, and intestinal tight junction in a diquat-induced mouse model. **RSC Advances**, Cambridge, v. 9, n. 55, p. 31988-31998, 2019.

WINDISCH, W. *et al.* Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. E140-E148, 2008. Supl. 14.

WOESE, Carl R.; FOX, George E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals**. Geneva: WHO, 2017.

YILMAZ, P. *et al.* The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 42, p. D643-D648, 2014.

ZHANG, B.; GUO, Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 102, n. 5, p. 687-693, 2009.

VITA

Lucas de marques Vilella, filho de João Carlos Vilella e Marise de Marques Vilella, nasceu em 6 de novembro de 1984 em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Se formou no Curso de Técnico em Zootecnia, pela Escola de Técnicas Agrícolas de Viamão (ETA) em 2009, ingressou no curso de Zootecnia na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul (UFRGS), no primeiro semestre de 2012.

Ao longo da graduação foi bolsista de iniciação científica no laboratório de ensino zootécnico (LEZO) sob orientação dos Professores Luciano Trevizan (2012) e Professora Andrea Machado Leal Ribeiro (2012 -2018).

Em abril de 2019 deu início ao curso de Mestrado do Programa de pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) na área de produção animal com ênfase em nutrição de monogástricos sob orientação da Professora Andrea Machado Leal Ribeiro.