

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

ALEXANDRE MACIEL VIEIRA

**MISTURA DE ÓLEOS FUNCIONAIS COMO PROMOTOR DE
CRESCIMENTO E SEU EFEITO NA MICROBIOTA INTESTINAL DE
AVES E SUÍNOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

ALEXANDRE MACIEL VIEIRA

**MISTURADE ÓLEOS FUNCIONAIS COMO PROMOTOR DE
CRESCIMENTO E SEU EFEITO NA MICROBIOTA
INTESTINAL DE AVES E SUÍNOS**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

ALEXANDRE MACIEL VIEIRA

**MISTURA DE ÓLEOS FUNCIONAIS COMO PROMOTOR DE
CRESCIMENTO E SEU EFEITO NA MICROBIOTA
INTESTINAL DE AVES E SUÍNOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência para obtenção do Diploma de
Graduação em Zootecnia da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientador(a): Prof. Dr^a Priscila de Oliveira
Moraes

**FLORIANÓPOLIS - SC
2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira, Alexandre

Mistura de óleos funcionais como promotor de crescimento
e seu efeito na microbiota intestinal de aves e suínos /
Alexandre Vieira ; orientadora, Priscila de Oliveira
Moraes, 2020.

122 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. coccidiose, desmame, frangos de corte,
leitões. I. de Oliveira Moraes, Priscila. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Zootecnia. III.
Título.

Alexandre Maciel Vieira

**MISTURA DE ÓLEOS FUNCIONAIS COMO PROMOTOR DE
CRESCIMENTO E SEUS EFEITOS NA MICROBIOTA
INTESTINAL DE AVES E SUÍNOS**

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 24 de novembro de 2020

Banca Examinadora:

Prof.^a Priscila de Oliveira Moraes, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Lucélia Hauptli, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Aline Félix Schneider Bedin, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial à minha mãe, Ieda Maciel Vieira.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe, Ieda Maciel Vieira, por sempre me apoiar e acreditar nos meus sonhos.

A todos os professores do curso de Zootecnia desta universidade, em especial às minhas orientadoras Prof^a Lucélia Hauptli e Prof^a Priscila de Oliveira Moraes, por terem me dado a oportunidade de trabalhar e aprender com vocês.

Aos demais funcionários da UFSC, técnicos(as) administrativos(as), porteiros(as), guardas, cozinheiros(as), faxineiros(as) entre outros, por contribuírem para o pleno funcionamento desta instituição, e, conseqüentemente, com nosso crescimento em quanto alunos.

Aos colegas de curso Ana Paula Peixoto, Ariana Ferreira, Daniela Nagy Bueno, Luiz Arthur Pereira e Maria Julia Martins por toda amizade nesta trajetória.

À Tatiany Aparecida Teixeira Soratto, doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências – PPGBTC/UFSC pelo precioso trabalho nas análises dos dados que compõem este TCC.

Aos amigos e ex colegas da Superintendência Federal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em Santa Catarina, em especial aos Auditores Fiscais Silvia Camargos e Leonardo Pessanha Moreira, por todos os ensinamentos durante meu período de estágio naquele órgão.

Ao CNPq, pelos meses que recebi bolsa de estudos durante a realização deste projeto.

RESUMO

O objetivo foi avaliar uma mistura comercial de óleos funcionais à base de líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona como promotor de crescimento e seu efeito na microbiota intestinal de frangos de corte desafiados por coccidiose e em leitões recém-desmamados. O primeiro experimento consistiu na avaliação de 864 frangos de corte machos de um dia de idade distribuídos em um arranjo fatorial 3 x 2 composto por três aditivos (controle, monensina ou mistura), com ou sem desafio por *Eimeriaspp.* aos 14 dias de idade. O conteúdo do intestinal foi coletado aos 28 dias de idade. O segundo experimento consistiu na avaliação de 225 leitões, machos castrados e fêmeas com 28 dias de idade, distribuídos em três tratamentos e cinco repetições (controle, probiótico, mistura). As fezes foram coletadas aos 50 dias de idade. Em ambos experimentos a análise da microbiota foi realizada por sequenciamento 16s rRNA nas regiões V3 e V4 usando o Illumina Plataforma MiSeq. A taxonomia foi atribuída por meio do banco de dados SILVA versão 132, usando o software QIIME 2 versão 2019.1. Nas aves, a microbiota intestinal foi dominada por membros da ordem Clostridiales e Lactobacillales, seguido pelas famílias Ruminococcaceae, Bacteroidaceae e Lactobacillaceae, independentemente do tratamento. Quando os controles foram comparados, no desafiado houve um aumento na Erysipelotrichaceae, Lactobacillaceae, Bacteroidaceae, Streptococcaceae e Peptostreptococcaceae, e uma diminuição em Ruminococcaceae. Resultados semelhantes foram encontrados para o grupo que recebeu monensina, enquanto a mistura mitigou parcialmente essa variação. Em leitões, Ruminococcaceae e Lachnospiraceae, seguidas por Prevotellaceae e Muribaculaceae foram as famílias predominantes em todos os tratamentos. Ambos aditivos foram eficazes em modular grupos centrais à saúde intestinal, como Ruminococcaceae e Lachnospiraceae. No entanto, os óleos funcionais foram mais efetivos em inibir bactérias patogênicas, como *Escherichia Coli* e *Campylobacter*.

A mistura de óleos funcionais demonstrou ser eficiente como modulador da microbiota intestinal tanto em frangos de corte desafiados por coccidiose quanto em leitões recém desmamados.

Palavras-chave: coccidiose, desempenho, desmame, frangos de corte, leitões, modulação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da regulação da barreira funcional intestinal.....	14
Figura 2 - Representação esquemática do conceito ‘One Health’	17
Figura 1 Artigo 1 - Alpha diversity at the family level.....	28
Figura 2 Artigo 1- Principal coordinate analysis (PCoA) of beta diversity based on Bray-Curtis dissimilarity.....	29
Figura 3 Artigo 1 - ASVs shared or unshared by the six treatments composed of three feed additives.....	31
Figura 4 Artigo 1 - Microbial distribution of the eighteen samples.....	32
Figura 5 Artigo 1 - The relative abundance of broilers gut microbiota treat with three feed additives.....	34
Figura S1 Artigo 1 - Rarefaction curve of the eighteen samples of the experiment composed of three feed additives.....	48
Figura 1 Artigo 2- Diversidade alfa em nível de família do experimento composto por três aditivos.....	65
Figura 2 Artigo 2 - Análise das coordenadas principais (PCoA) da diversidade beta com base na dissimilaridade de Bray-Curtis do experimento composto por dois aditivos alimentares...66	66
Figura 3 Artigo 2 - ASVs compartilhados ou não compartilhados pelos três tratamentos compostos de dois aditivos.....	67
Figura 4 Artigo 2 - Distribuição microbiana das catorze amostras.....	68
Figura 5 Artigo 2 - Abundância relativa da microbiota intestinal de leitões desmamados tratada com dois aditivos.....	70
Figura S1 Artigo 2 - Abundância relativa da microbiota intestinal de leitões desmamados tratada com dois aditivos.....	91
Figura S2 Artigo 2 - Curva de rarefação das catorze amostras do experimento compostas por dois aditivos.....	91
Figura S3 Artigo 2 - Concentração de Escherichia Coli na nas fezes de leitões aos 50 dias de idade recebendo diferentes aditivos.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela S1 Artigo 1 - The number of reads that passed through each step of the quality control for the eighteen samples.....	48
Tabela S 2 Artigo 1 -Alpha diversity of the intestinal microbiota of broilers at the family level.....	49
Tabela S 3 Artigo 1 - Relative abundance of phylum, class, order, family, and genera present in the gut microbiota of broilers.....	50
Tabela 1 Artigo 2 -Efeito da dieta com diferentes aditivos no desempenho de suínos desmamados.....	63
Tabela S1 Artigo 2 -Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais.....	93
Tabela S2 Artigo 2 - Controle de qualidade para as quinze amostras do experimento compostas por três aditivos.....	94
Tabela S3 Artigo 2 - Abundância relativa de filo, classe, ordem, família e gêneros presentes na microbiota intestinal de leitões desmamados.....	96
Tabela S4 Artigo 2 - Análise de sangue de leitões aos 50 dias de idade recebendo diferentes aditivos via ração.....	108

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVO GERAL.....	12
2.1	Objetivos específicos.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	Saúde intestinal: um equilíbrio entre nutrição, microbiota e sistema imune.....	12
3.2	Antimicrobianos promotores de crescimento.....	15
3.3	Fitogênicos como alternativo aos antibióticos – APCs.....	17
3.4	Estudos com microbiota intestinal de frangos de corte.....	18
3.5	Estudos com microbiota em leitões recém desmamados.....	20
4	ARTIGO 1 – Artigo publicado na revista Plos One.....	22
5	ARTIGO 2 – Artigo formatado de acordo com as normas da revista Plos One.....	56
6	Considerações finais.....	109

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal pode ser definida como a comunidade de microrganismos (principalmente bactérias, mas também vírus, fungos e protozoários) que fisiologicamente vive em simbiose com o hospedeiro ao nível do trato digestivo (ANDREA *et al.*, 2018; GUARNER & MALAGELADA, 2003).

Quanto mais equilibrado a microbiota intestinal, mais resistente o intestino se torna quando desafiado (KIARIE; ROMERO; NYACHOTI, 2013; OAKLEY *et al.*, 2014). Em frangos de corte, *Eimeria* spp. parasitas, que são responsáveis pela coccidiose, uma doença que afeta gravemente a indústria avícola global, são um dos fatores que impactam a microbiota, causando danos ao epitélio intestinal, alterações na resposta imune, reduzindo a digestão de nutrientes e, conseqüentemente, os índices de desempenho (STANLEY *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017).

Enquanto em leitões à fase de creche, a disbiose da microbiota é induzida por mudanças abruptas na dieta e no ambiente, sendo uma das principais causas de diarreia pós-desmame (GRESSE *et al.*, 2017). A diarreia tem como principal agente patogênico a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) K88 (PAN *et al.*, 2017) que na disbiose encontra ambiente favorável para se proliferar.

Durante muitas décadas a utilização de antibióticos com finalidade terapêutica e profilática foi a principal ferramenta para minimizar o impacto negativo de ambas enfermidades (CAIRO *et al.*, 2018).

Em aves, por exemplo, a monensina têm sido a principal droga de escolha para o controle da coccidiose. No entanto, o uso contínuo de antimicrobianos, como a monensina, pode causar resistência dos parasitas (CHAPMAN; JEFFERS; WILLIAMS, 2010). Já se descobriu que algumas famílias bacterianas, como Enterobacteriaceae, são resistentes a quase todos os antibióticos, incluindo antimicrobianos de última geração (GROSS, 2013).

Neste contexto pessimista, tem-se estimulado a pesquisa de aditivos alternativos com potencial similar, como os probióticos e os fitogênicos (DIAZ CARRASCO *et al.*, 2018; MINGMONGKOLCHAI & PANBANGRED, 2018; UPADHAYA & KIM, 2017).

Os probióticos são microrganismos vivos que agem modulando a microbiota intestinal do hospedeiro, e tem sido considerados uma das melhores alternativas aos antibióticos como promotores de crescimento na dieta de animais de produção devido aos seus benefícios à saúde (VOHRA; SYAL; MADAN, 2016). Entre os fitogênicos, os óleos funcionais são caracterizados por compostos bioativos naturais derivados de plantas, e tem sido difundidos,

principalmente, como antimicrobianos e, também, moduladores da microbiota intestinal (ALAGAWANY *et al.*, 2018; OMONIJO *et al.*, 2018).

A mistura comercial contendo óleos funcionais de líquido de casca de castanha de caju e óleo de mamona já demonstrou efeitos positivos no desempenho e na modulação do sistema imune de frangos de corte desafiados por coccidiose (MORAES *et al.*, 2019b; MURAKAMI; EYNG; TORRENT, 2014). Porém, inexistem estudos analisando os efeitos deste produto na composição microbiana intestinal de aves (dados das aves já publicados na presente data) e suínos.

Posto isso, o objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação com uma mistura de um produto comercial à base do líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona no desempenho e composição da microbiota intestinal de aves desafiadas por coccidiose e leitões recém-desmamados.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar uma mistura comercial de óleos funcionais a base de líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona como promotor de crescimento e seu efeito na microbiota de frangos de corte desafiados por coccidiose e leitões recém-desmamados.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito de uma mistura comercial de óleos funcionais à base de líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona como modulador da microbiota intestinal de frangos de corte desafiados por coccidiose em comparação com monensina.

Avaliar uma mistura comercial de óleos funcionais à base de líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona como promotor de crescimento e seu efeito na microbiota de leitões recém desmamados em comparação a um probiótico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Saúde intestinal: um equilíbrio entre nutrição, microbiota e sistema imune

No intestino de mamíferos e aves habitam bilhões de microrganismo que formam a microbiota. De uma perspectiva ecológica, há evidências que a evolução do sistema

imunológico coincidiu com a colonização da microbiota intestinal (BELKAID & HARRISON, 2017; LEY *et al.*, 2008).

A relação íntima da microbiota intestinal e seus hospedeiros tem um papel importante na regulação da fisiologia destes e na prevenção de infecções patogênicas, enquanto o sistema imunológico orchestra a manutenção das características-chave da simbiose hospedeiro-microbiota (LEI; NAIR; ALEGRE, 2015; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020), permitindo a indução de respostas protetoras a patógenos e a utilização de vias regulatórias envolvidas na tolerância sustentada a antígenos inócuos (BELKAID & HARRISON, 2017).

Alterações na composição da microbiota estão associadas a um grande número de doenças, tanto entéricas quanto sistêmicas (ERICSSON & FRANKLIN, 2015). Um estudo com ratos demonstrou que a depleção da microbiota intestinal, causada propositalmente com antibióticos, resultou em progressão de doença induzida por gammaherpesvirus (YARON *et al.*, 2020). Segundo os autores isso ocorre porque os antibióticos suprimem os efeitos imunoestimulantes do microbioma intestinal, reduzindo ainda mais a resposta imune e piorando a doença.

Resumidamente, a barreira intestinal é constituída pelo epitélio, camada de muco (ou camada mucoide) e a lâmina própria, onde está o sistema imune (OKUMURA & TAKEDA, 2018), conforme Figura 1.

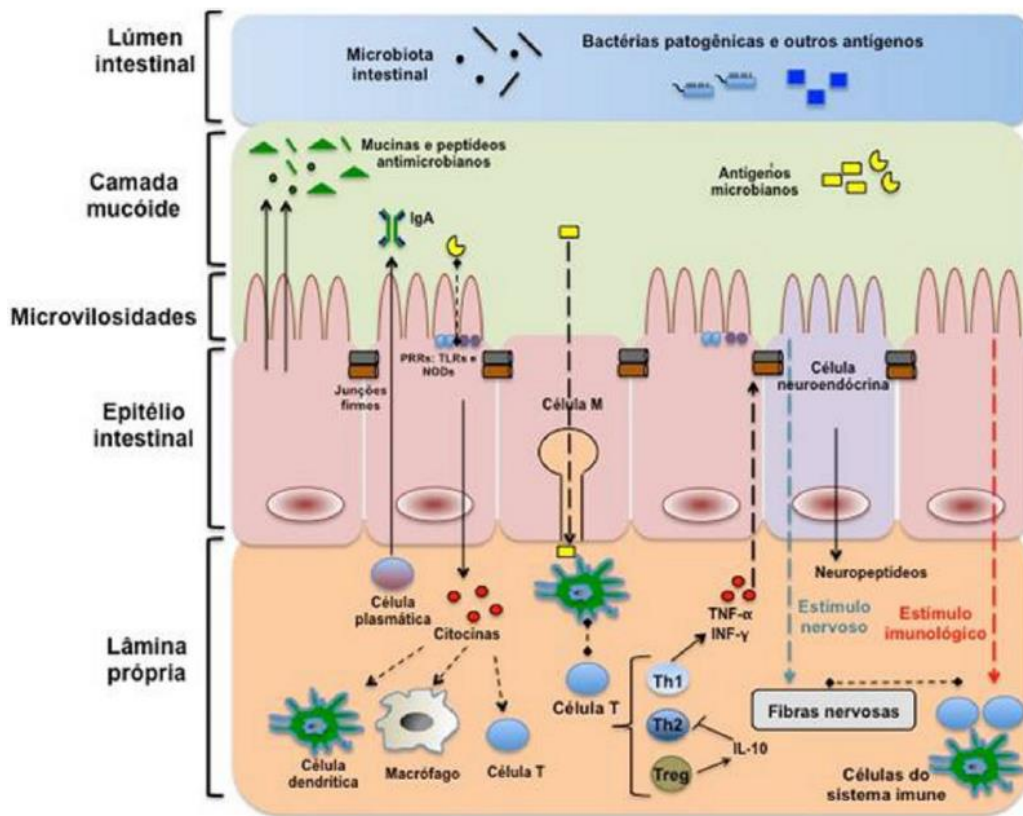


Figura 1 -Representação da regulação da barreira funcional intestinal.

Fonte: ORIÁ E BRITO (2016)

Diversos componentes atuam na manutenção da homeostase desta barreira. No lúmen intestinal, a microbiota residente tem papel protetor contra bactérias patogênicas, evitando a colonização e invasão no epitélio (ORIÁ & BRITO, 2016). A camada mucóide, com peptídeos antimicrobianos e mucinas, funciona como barreira primária à translocação de antígenos microbianos (MCGUCKIN *et al.*, 2011). As imunoglobulinas presentes nesta camada (IgA) são estimuladas pela fermentação microbiana e limitam a entrada do patógeno através das células epiteliais intestinais (CHE *et al.*, 2014).

A regulação imunológica da barreira se inicia com a ativação por antígenos de receptores de reconhecimento padrão (PPRs), receptores Toll-like, receptores RIG-1-like, entre outros (KIM, 2018), que por sua vez agem na atividade epitelial através de sinais químicos da microbiota, permitindo que as células epiteliais ajustem sua resposta antimicrobiana para modular o sistema imune à resposta inflamatória (POTT & HORNEF, 2012). Algumas células do epitélio intestinal, especializadas em endocitar e transportar antígenos para a lâmina própria, têm a capacidade de ‘conversar’ com os linfócitos, ativando e induzindo populações de células T (DAHAN *et al.*, 2007). Neste

processo, os mediadores inflamatórios (citocinas TNF- α e IFN- γ) liberados podem modificar as funções das junções firmes, levando à distúrbios de permeabilidade intestinal (ORIA & BRITO, 2016).

Posto isso, torna-se evidente que danos à barreira intestinal causados por disbioses, à exemplo, *Clostridium perfringens* em aves (DU *et al.*, 2016) e *Escherichia coli* enterotoxigênica em suínos (ETEC) K88 (PAN *et al.*, 2017), podem atuar facilitando a invasão de bactérias na mucosa intestinal, induzindo respostas imunes exacerbadas, e resultando em inflamação intestinal e homeostase orgânica desequilibrada dessas espécies (KITESSA *et al.*, 2014; MCLAMB *et al.*, 2013).

A ativação do sistema imune é de extrema importância para a supressão do patógeno (KOGUT, 2013; LIU, 2015). No entanto, se a resposta inflamatória for descontrolada, além de causar danos intestinais e prejudicar as funções digestivas do intestino (MCLAMB *et al.*, 2013), acarretará, também, em aumento na demanda por energia desviando esta e nutrientes do crescimento para a resposta inflamatória, aumentando, assim, a demanda basal (CHILDS; CALDER; MILES, 2019; DIANGELO *et al.*, 2009; JOHNSON, 2012).

Logo, a interação entre a nutrição, a microbiota e a imunidade é particularmente importante para o crescimento e produtividade animal (PAN & YU, 2014). A suscetibilidade dos animais pode estar relacionada com a resistência ou resiliência, sendo a resistência a capacidade de exclusão do patógeno e a resiliência a capacidade do animal em manter a produtividade durante o desafio infeccioso (MORAES, 2017). Assim sendo, o intuito da nutrição é aumentar a resiliência dos animais (MACHADO & FONTES, 2005; PAUL & DEY, 2015; YANG & COOK, 2003).

3.2 Antimicrobianos promotores de crescimento

A qualidade e a segurança alimentar têm sido uma questão importante e urgente nos últimos anos (RONQUILLO & HERNANDEZ, 2017). O uso de antibióticos como promotores de crescimento na indústria animal tem representado um risco não só a segurança alimentar, como também ao meio ambiente, e tem chamado atenção de órgãos como Agencia Mundial da Saúde (OMS), Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial para Saúde Animal (OIE) (GEORGE, 2018).

Os antibióticos têm sido um aliado importante na indústria animal desde a década de 1950, quando seu uso como promotor de crescimento, principalmente na indústria de aves e suínos, deu início a sua era de ouro (ZHAI *et al.*, 2018). Porém, de lá para cá a diminuição no

ritmo de descoberta de novas moléculas com diferentes mecanismos de ação dos antibióticos e o uso indiscriminado de medicamentos já existentes, resultou no surgimento de resistência bacteriana aos antibióticos (LEKSHMI *et al.*, 2017; ZHAI *et al.*, 2018). Um estudo dos anos 2000 nas aldeias rurais de Barcelona já sugeria fezes de aves e suínos como uma possível fonte de *Escherichia coli* resistente às quinolonas à maior taxa de infecção por este agente patogênico em crianças nunca expostas a estes antibióticos (GARAU *et al.*, 1999).

No mesmo caminho, em um estudo global, pesquisadores da Universidade de Princeton, VAN BOECKEL *et al.* (2015) revelaram que dos anos 2000 para cá a ocorrência de resistência bacteriana a antibióticos utilizados na indústria animal quase triplicou em países como China e Índia, com Brasil e Quênia emergindo como novos pontos críticos. Dados deste mesmo estudo tornam o cenário ainda mais crítico, pois a projeção é que o consumo de antimicrobianos na indústria animal, pressionado pela demanda de produtos de origem animal, aumentará 67% até 2030 e quase dobrará nestes mesmos países.

Um relatório da Organização das Nações Unidas (ONU) ORGANIZATION (2017), mostrou que em 2017 cinquenta e um (51) novos antibióticos e biológicos estavam em desenvolvimento para tratar patógenos resistentes a antibióticos prioritários. Porém, apenas oito (8) foram classificados como verdadeiramente inovadores, evidenciando a necessidade de priorizarmos as drogas já existentes para intervenções terapêuticas realmente necessárias, tanto em humanos como em animais.

Frente ao exposto, os dados nos apontam uma saída para uma crise global no uso de antibióticos como promotores de crescimento na indústria animal: o investimento em pesquisa de compostos alternativos, como probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, enzimas, fitogênicos, entre outros (GADDE *et al.*, 2017).

A utilização de compostos alternativos aos antibióticos como promotores de crescimento vem como uma ferramenta para mitigar problemas atuais, como reduzir substancialmente o uso de antibióticos, e com isso obter benefícios, como menor resistência bacteriana em animais, menor risco de resistência bacteriana cruzada em humanos, e menos resíduos disseminados no meio ambiente (TANG *et al.*, 2017); e, também, reduzir a queda nos índices zootécnicos dos animais em virtude da redução no uso de antibióticos como promotores de crescimento (LANGEMEIER *et al.*, 2017).

Cabe salientar que a OIE reconhece a saúde humana e a saúde animal como interdependentes e relacionadas aos ecossistemas em que eles coexistem (ZINSSTAG *et al.*, 2020), conforme Figura 2.



Figura 2 -Representação esquemática do conceito 'One Health'.

Fonte: Gustavo Coelho 2018 (adaptado).

Portanto, ao discutirmos a questão da antibióticoterapia na indústria animal, e seus potenciais alternativos, devemos fazê-lo à luz de uma saúde integrada entre os mais diversos setores da sociedade.

3.3 Fitogênicos como alternativo aos antibióticos - APCs

A recente restrição de antibióticos como promotores de crescimento, principalmente na indústria avícola, tem colocado os aditivos fitogênicos como uma das alternativas ao uso de antibióticos na alimentação animal (MURUGESAN *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que os fitogênicos na dieta de animais podem melhorar características de interesse zootécnico,

saúde intestinal do hospedeiro, segurança e qualidade da carne da carcaça em animais (ELAGAWANY, 2015; UPADHAYA; KIM; KIM, 2016b). Um dos motivos é que estes aditivos possuem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, pois são compostos por uma mistura complexa de substâncias voláteis, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e aldeídos, entre outros compostos farmacologicamente ativos (APPLEGATE *et al.*, 2010).

Entre os óleos essenciais utilizados como aditivos antimicrobianos na indústria animal os principais compostos são, eugenol, cinnamaldeído, timol e carvacrol (PEI, 2009). A suplementação, por exemplo, com 300 ppm de óleo essencial de orégano (à base de carvacrol) melhorou a eficiência alimentar de frangos de corte (MOHITI-ASLI & GHANAATPARAST-RASHTI, 2017). Em outro estudo também com frangos de corte, os óleos essenciais de Alecrim e Erva-dos-Carpinteiros (ambos à base de timol e carvacrol), se mostraram efetivos na melhoria de desempenho e microbiota ileal (NOROUZI *et al.*, 2015).

Já em leitões, a suplementação de uma mistura de óleos essenciais à base de cinamaldeído (4.5%) e timol (13.5%) inferiu positivamente em características de interesse zootécnico, como maior ganho de peso diário (GPD) e menor conversão alimentar (CA) ($P < 0,05$) (ZENG *et al.*, 2015).

Óleos essenciais são líquidos aromáticos e voláteis obtidos de materiais vegetais por destilação a vapor e batizados com o nome da planta da qual são derivados (RIOS, 2016). Por sua vez os óleos funcionais são definidos como aqueles óleos que possuem uma ação além do valor nutricional (MURAKAMI; EYNG; TORRENT, 2014), ou seja, que podem melhorar estados de doença ou simplesmente manter a saúde de quem o ingere (SCHMIDL & LABUZA, 2000); e são extraídos, geralmente, por prensagem mecânica e posterior filtragem (SOUSA, 2012).

A mistura comercial contendo óleos funcionais de líquido de casca de castanha de caju e óleo de mamona, avaliada neste estudo, já demonstrou efeitos positivos no desempenho, na modulação da microbiota intestinal e sistema imune de frangos de corte desafiados por coccidiose (MORAES *et al.*, 2019b; MORAES *et al.*, 2019a; MURAKAMI; EYNG; TORRENT, 2014; VIEIRA *et al.*, 2020), porém nenhum estudo com suínos foi publicado até o presente momento.

3.4 Estudos com microbiota intestinal de frangos de corte

O estudo da microbiota intestinal na produção animal busca compreender o complexo consórcio de microorganismos intestinais e suas interações com uma melhor eficiência alimentar e produtividade dos animais, permitindo a otimização dos ingredientes da ração (SAHU *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal tem um papel importante na saúde e na produção das aves de produção, influenciando positivamente o desenvolvimento gastrointestinal, bioquímica, imunologia, fisiologia, e na patogênese das doenças intestinais, por exclusão competitiva de microorganismos e ativação do sistema imune (SAHU *et al.*, 2017; STANLEY; HUGHES; MOORE, 2014). Logo, uma microbiota intestinal em equilíbrio implica em economia de energia para o hospedeiro, o que se traduz em uma melhoria no desempenho produtivo das aves (DIAZ CARRASCO; CASANOVA; FERNÁNDEZ MIYAKAWA, 2019).

As aves de produção possuem uma estrutura microbiana diversa e complexa ao longo do trato gastrointestinal (contendo até ≥ 500 filotipos ou ~ 1 milhão de genes bacterianos), e sua plasticidade pode ser facilmente modificada por dieta, ingestão de antibióticos e infecção por patógenos, por exemplo (KOGUT, 2019). A principal responsável pela disbiose intestinal em frangos de corte é a coccidiose – causada pelo agente patogênico *Eimeria spp* (STANLEY *et al.*, 2014). Como se sabe, o aumento na liberação de proteínas plasmáticas para o lúmen, decorrentes de infecção por *Eimeria spp*, pode servir como substrato para a proliferação extensiva de *Clostridium perfringens* (TIMBERMONT, 2011)

Além de *Clostridium perfringens*, outras bactérias como *Salmonella* e *Campylobacter*, têm ganhando interesse em pesquisas não só por serem altamente prejudiciais ao desempenho das aves, mas, também, por representarem um risco eminente aos seres humanos. O último relatório da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e Centro Europeu para a Prevenção de Doenças (ECDC) (AUTHORITY; PREVENTION; CONTROL, 2018) apontou as duas últimas como sendo os dois principais patógenos responsáveis pela gastroenterite humana devido ao consumo de carne de aves.

Em frangos de corte, os dois principais filos dominantes são Firmicutes e Bacteroidetes, respectivamente (CHEN *et al.*, 2020). Do ponto de vista científico, essa é uma informação bastante importante, visto que há evidências que o desequilíbrio na razão Firmicutes:Bacteroidetes na microbiota intestinal, com diminuição de Firmicutes e aumento de Bacteroidetes, está relacionado a perda de peso, e o inverso ao ganho de peso em humanos (MITEV & TALESKI, 2019; MURUGESAN *et al.*, 2015). Embora em aves os estudos ainda sejam limitados.

Já se sabe, contudo, que membros de Firmicutes estão associados à eficiência da captação de energia em vários animais (HOU *et al.*, 2016; WANG; LILBURN; YU, 2016). Enquanto, alguns gêneros de Bacteroidetes, em situação de disbiose intestinal, estão associados à redução da eficiência alimentar em aves (BETANCOURT *et al.*, 2019).

Quando em equilíbrio, essa relação desempenha papel importante na otimização da dieta pelo hospedeiro. Evidências apontam que Bacteroidetes codificam um grande número de enzimas ativas de carboidratos podendo alternar prontamente entre diferentes fontes de energia (LAPÉBIE *et al.*, 2019). Enquanto Firmicutes tem membros mais nutricionalmente especializados na degradação de substratos complexos, como paredes celulares de plantas, partículas de amido e mucina (FLINT *et al.*, 2012; SHERIDAN *et al.*, 2016).

A exemplo de membros benéficos de Firmicutes cita-se os *Lactobacillus spp.*, que têm sido amplamente pesquisados, inclusive como probióticos, devido às suas propriedades benéficas para o hospedeiro, como otimização no ganho de peso e redução dos escores de lesões intestinais em animais (GIANNENA *et al.*, 2012; QING *et al.*, 2017).

Em vista dos argumentos apresentados, torna-se evidente a necessidade de uma melhor compreensão da função da microbiota intestinal em frangos de corte, o que nos permitirá promover a saúde e produção destas aves, além de proporcionar maior segurança alimentar aos consumidores desta proteína.

3.5 Estudos com microbiota em leitões recém desmamados

Assim como em frangos de corte, a microbiota intestinal de suínos é bastante complexa, e assemelha-se muito a de humanos, motivo pelo qual tem estimulado a utilização de suínos como modelo em estudos com microbiota (CRESPO-PIAZUELO *et al.*, 2018).

Apenas como parâmetro, por exemplo, em um humano a microbiota intestinal consiste em 100 trilhões de micróbios, que contribuem com quase 2 kg do seu peso corporal (FLINT *et al.*, 2012). O interesse em pesquisas com microbiota intestinal de suínos se dá, também, é claro, em decorrência do potencial dessa espécie como proteína animal (CRESPO-PIAZUELO *et al.*, 2018), estando entre as proteínas de origem animal mais consumidas no mundo (ALFAIA *et al.*, 2019).

Na suinocultura, a fase de desmame é uma das mais importantes, pois é nessa fase que acontecem mudanças significativas na microbiota intestinal de leitões que impactarão todo seu desenvolvimento futuro (ISAACSON & KIM, 2012). Nessa espécie, Firmicutes e Bacteroidetes costumam ser os filos mais abundantes durante o pré e pós-desmame, seguido

por *Prevotella* (PAJARILLO *et al.*, 2014). Assim como vimos em frangos de corte, a relação Firmicutes:Bacteroidetes nessa espécie também desempenha papel fundamental na melhor utilização da dieta.

O estresse e, conseqüentemente, infecções decorrentes do desmame podem causar flutuação de membros importantes desses filos, como, por exemplo, a diminuição de *Lactobacillus* (Firmicutes) e perda da diversidade microbiana, e o favorecimento de bactérias patogênicas, como *Clostridium spp.* (Firmicutes), *Prevotella spp.* (Bacteroidetes). e *E. coli* (Proteobactéria) (GRESSE *et al.*, 2017). *Lactobacillus spp.* são conhecidos por serem o principal grupo benéfico aos hospedeiros (KONSTANTINOV *et al.*, 2006). Enquanto *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é o principal agente infeccioso da diarreia no período de creche em leitões (PAN *et al.*, 2017).

Proteobactéria apesar de não ser um dos filos mais abundantes, comporta patógenos de grande potencial infeccioso, além de *E. coli* como vimos anteriormente, a *Salmonella enterica sorovar Typhimurium* é um importante patógeno gastrointestinal zoonótico responsável por doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo (DRUMO *et al.*, 2016). Os suínos são importantes reservatórios de infecção para humanos, pois são portadores assintomáticos de sorovares de ampla gama de hospedeiros de *Salmonella* (PIRES; DE KNEGT; HALD, 2011).

Já se sabe que parte dessas bactérias patogênicas utilizam glicanos do muco epitelial intestinal, decorrente de infecções, como substratos para se proliferarem (BÄUMLER & SPERANDIO, 2016; OUWERKERK; DE VOS; BELZER, 2013). Por exemplo, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) K88 utilizam eficientemente alguns monossacarídeos derivados de muco para se proliferar.

Logo, manipular da microbiota intestinal de modo a favorecer a microbiota comensal benéfica em detrimento de microrganismos patogênicos é importante para ajudar no balanço de energia do hospedeiro, e também à sua saúde, conferindo conseqüentemente maior eficiência alimentar dessa espécie.

4 ARTIGO 1 – Artigo publicado na revista Plos One

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237118>

Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with Monensin or functional oils in response to the challenge by *Eimeria spp.*

Alexandre Maciel Vieira¹, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto², Kátia Maria Cardinal³, Glauber Wagner², Lucélia Hauptli¹, André Luis Ferreira Lima¹, Fabiano Dahlke¹, Diego Peres Netto¹, Priscila de Oliveira Moraes¹, Andréa Machado Leal Ribeiro³

¹Department of Animal Science and Rural Development, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Laboratory of Bioinformatics, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

³Department of Animal Science, Laboratory of Animal Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: p.agronomia@gmail.com (POM)

The authors contributed equally to this work.

¹ O presente artigo foi publicado na Revista PLOS ONE em 7 de agosto, de 2020.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation of a 100ppm of sodium Monensin or 0.15% of a Blend of functional oils (cashew nut oil + castor oil) on the intestinal microbiota of broilers challenged with coccidiosis. The challenge was accomplished by inoculating 1mL of sporulated oocysts with *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. A total of 864-day-old male chicks (Cobb) were randomly assigned to receive 6 treatments (8 pens / treatment; 18 broilers / pen) in a 3×2 factorial, composed of 3 additives (Control, Monensin or Blend) challenged or not. Intestinal content was collected at 28 days of age for microbiota analysis by sequencing 16s rRNA in regions V3 and V4 using the Illumina MiSeq platform. Taxonomy was assigned through the SILVA database version 132, using the Qiime 2 software version 2019.1. No treatment effect ($p > 0.05$) were observed in the microbial richness at the family level estimated by the Chao1 and the biodiversity assessed by Simpson index, except for the index Shanon's ($p < 0.05$). The intestinal microbiota was dominated by members of the families Ruminococcaceae and Bacteroidaceae, followed by the genera *Lactobacillus* and *Ruminococcus* and by the order Clostridiales. Supplementation with Monensin decreased the Firmicutes: Bacteroidetes ratio in challenged birds, while the Blend partially mitigated this variation. Bacteroidaceae and Streptococaceae increased, and the relative abundance of Enterococaceae, Lactobacillaceae and Ruminococcaceae was reduced in the group challenged with Monensin supplementation, while Enterococaceae, Lactobacillaceae, Peptostreptococaceae and Akkermansiaceae were stimulated and had the variation in relative abundance mitigated by supplementation with Blend in non-challenged and challenged groups. In this way, the Blend provided less impact on the structure of the broiler microbiome challenged by coccidiosis when compared to the ionophore Monensin.

Introduction

When the microbiome is balanced, the intestine becomes more resilient when challenged [1, 2]. Among the factors that cause changes in the structure of the intestinal microbiota is the parasite *Eimeria spp.*, responsible for coccidiosis which is a disease that directly affects the global poultry industry, because coccidiosis causes changes in the immune response of broiler chickens, reduce the digestion of nutrients and, consequently, reduce the performance indexes [3-5].

Ionophores have been the main choice for controlling coccidiosis. Monensin is an ionophore that forms fat-soluble complexes with sodium and potassium, causing increased permeability of the coccidia membrane, which can lead to intoxication and death due to depletion of cellular energy [6]. This mechanism also occurs in bacteria and may be related to changes in the intestinal microbiota, although there are still few studies relating the use of Monensin and its impacts on the microbiota. Lu et al. [7] observed that supplementation with Monensin provided a greater relative abundance of gram-negative bacteria, such as Proteobacteria, Bacteroides and some genera of Clostridia. Danzeisen et al. [8] observed the combination of Monensin with Virginiamycin and Tylosin increased the presence of *E. coli*, *Lactobacillus* and *Enterococcus*. In addition, the intensive use can cause parasite resistance to Monensin [9], stimulating research for alternative additives with similar potential, such as phytogenics [10-13].

Phytogenic feed additives can have antimicrobial and anti-inflammatory properties, because they are composed of a complex mixture of volatile substances, such as terpene hydrocarbons, simple alcohols and aldehydes, among other pharmacologically active compounds [14]. Among phytogenic additives, functional oils are defined as those that have

an action beyond the nutritional value [15]. An example is the mixture of cashew nut liquid and castor oil (CNSL castor oil). Diaz Carrasco et al.[13] evaluating diet supplemented with a blend of tannins derived from chestnut (*Castanea sativa*) and quebracho (*Schinopsis lorentzii*) observed positive effects on the diversity of cecal microbials with enrichment of beneficial bacteria to the host, such as Ruminococcaceae and Lachnospiraceae.

Noting the need for further studies on phytogetic additives and their possible effects on the intestinal microbiota, the objective of this study was to evaluate the effect of supplementation of Monensin or a Blend of functional oils on the intestinal microbiota of broilers challenged with coccidiosis.

Material and methods

The work described here was conducted in accordance with the protocol number 29814 was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Rio Grande do Sul, following the legislation for the protection of animals used for scientific purposes (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

Bird husbandry and experimental design

A total of 864 1-day-old male chicks (Cobb 500) were obtained from a commercial hatchery and housed in two identical experimental rooms, one for challenged and one for unchallenged birds, thus avoiding cross-contamination. The rooms were composed of 48 pens with an initial density of 18 birds per pen. Each group were housed in a 1 m² pen, equipped with two nipple drinkers and one tubular feeder located in a controlled-temperature room. Food and water were provided ad libitum throughout the experimental period. The nutritional program was based on the nutritional requirements recommended by the Brazilian Tables of Pigs and Swine [16].

The experimental design was completely randomized in a 3×2 factorial arrangement, composed by feed additives (basal diet, 100 ppm sodium Monensin, or 0.15% Blend) and sanitary challenge (challenged or unchallenged with coccidiosis). Both feed additives, Blend and Monensin sodium (Elanco Animal Health, Greenfield, IN), were introduced by replacing inert (kaolin) in the basal diet at all phases.

Challenge and sample collection

At 14 days of age, 1 mL of sporulated oocysts of *E. tenella* (10×10^3), *E. acervulina* (200×10^3) and *E. maxima* (80×10^3) was inoculated by gavage. The oocysts were acquired at the Laboratório de Biologia Molecular de Coccídias (University of São Paulo/ Brazil). To provide the same management stress, unchallenged broilers received 1 mL of saline.

At 28 days of age, intestinal contents were collected of 24 birds per treatment. A portion of 10 cm of each segment: duodenum segments (from the pylorus exit to the end of the descending duodenal loop), jejunum (descending duodenal loop to the Meckel's diverticulum), and ileum (diverticulum to ileocecal insertion) was removed and immediately stored at -20°C .

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

These samples were placed in a 1.5 mL sterile tube and sent to Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis-SC, Brazil). All procedures were performed according to the methodology described by [17]. The sample preparation and sequencing were performed by Neopropecta Microbiome Technologies. For total DNA extraction, the commercial QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. It consisted of the 16S rRNA V3/V4 region, which was amplified using 341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') primers, with Illumina adapters, necessary for sequencing. The amplification was performed in 35 cycles at 50°C

of annealing temperature, which was triplicated for each sample. The sequencing was performed by Illumina MiSeq using V2 kits, with a single-end 300 nt runs.

Sequence analysis

The read of their quality were evaluated using FastQC software (version 0.11.5). Poor quality reads were removed and adapters utilizing the Trimmomatic program. The reads were subjected to a Denoising approach for low-quality sequence removal, sequencing error correction, chimera removal, and identification of the variations of sequence amplification (ASVs) using the DADA2 method. Taxonomy was attributed to OTUS using the SILVA database version 132, with a 97% correspondence, employing the Qiime 2 version 2019.1 software [18].

Statistical analysis

Relative abundance, alpha rarefaction, alpha (Chao-1, Shannon and Simpson), and beta diversity indices were performed using program R, version 3.6 (<https://www.R-project.org/>), and the plyr (v. 1.8.4)[19], reshape2 (v. 1.4.3) [20], and phyloseq (v. 1.14.0)[21] packages. Beta diversity was estimated after sequence number normalization by randomly choosing sequences in the samples so that each sample obtained the same number of sequences. After normalization, a principal coordinate analysis (PCoA) and a heatmap were performed using the Bray-Curtis dissimilarity index with the vegan (v. 2.4.1) [22] and heatmaps (v. 1.8.0) [23] packages. The Venn diagram and the UpsetR were generated using the venn (v. 1.7) [24] and the UpSetR (v. 1.4.0) [25] R packages. Relative abundance and alpha diversity were tested using the Kruskal – Wallis test. Similarity analysis (ANOSIM) tests were conducted based on the beta diversity.

Results

Sequencing data

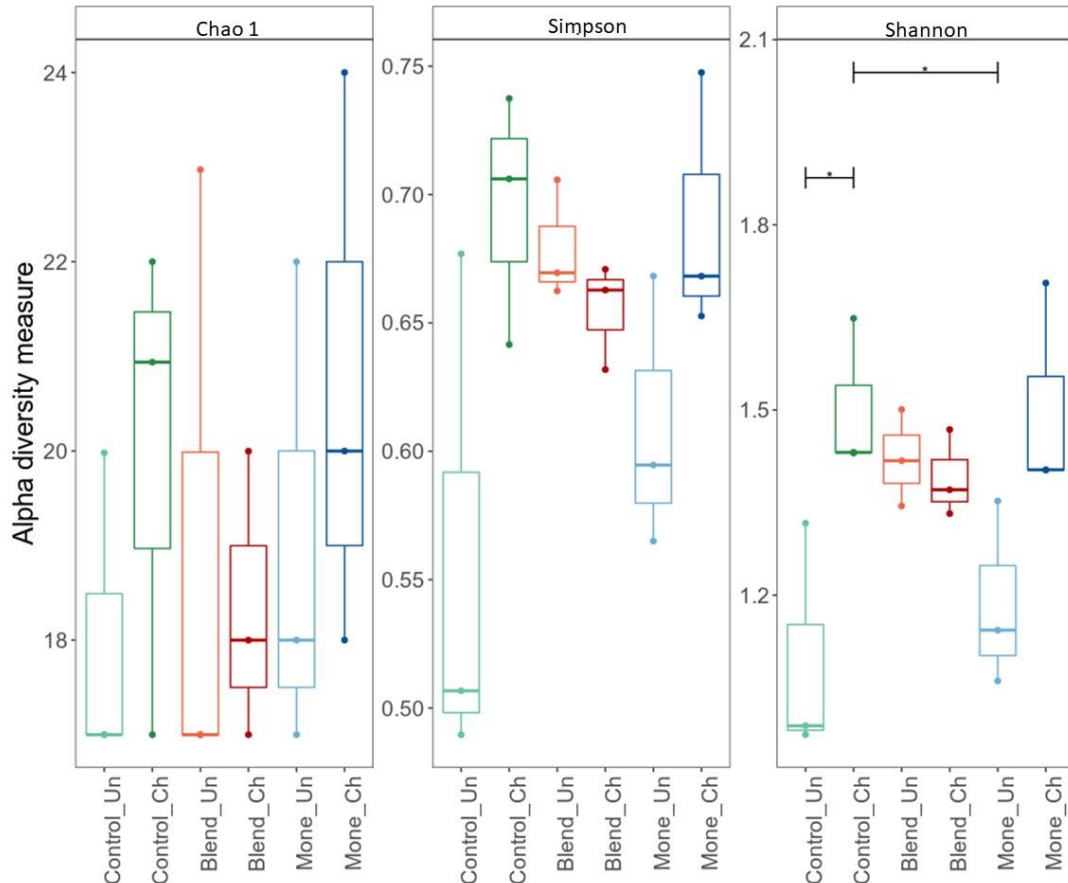
A total of 728,462 quality trimmed sequences were produced with an average number of sequences per sample of $40,470.11 \pm 7,580.40$. These were processed and classified into 1,088 variations of sequence amplification (ASVs). Number of reads that passed through each step of the DADA2 pipeline are presented in S1 Table 1.

Rarefaction curves generated from the ASVs (Fig. S1) showed high sequencing coverage in all samples. The rarefaction curves tended to reach the saturation plateau, showing that the microbiota of the 18 samples was large enough to estimate phenotype richness and microbial community diversity.

Variation in alpha and beta diversity of the microbiota

The Chao 1 index (minimum number of ASV present in a sample) was based on the richness of families present in the sample. The Shannon index considered uniformity in families abundance, and the Simpson index was based on dominance of abundance. In all evaluations, the Control and the Monensin group showed greater variation and higher indexes when challenged. (Fig 1).

Fig1. Alpha diversity at the family level of the experiment composed of three feed additives, basal diet (control), sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis.

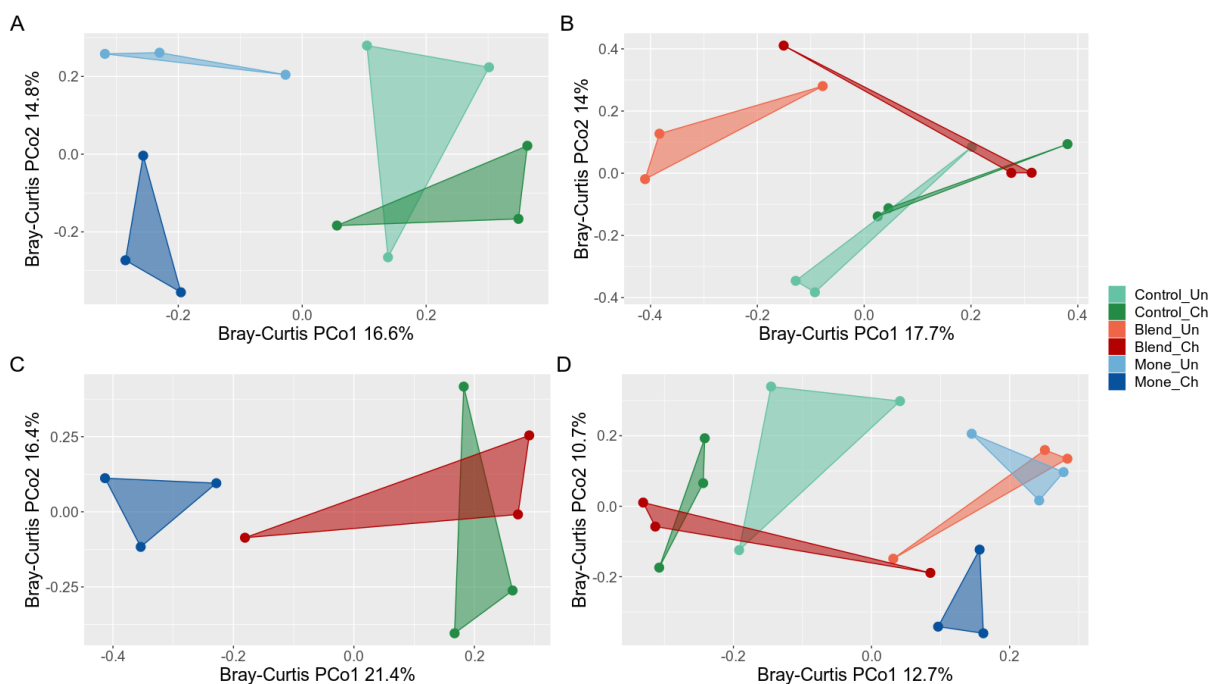


However, only the Shannon index showed significant differences among the six groups after infection ($p < 0.05$). While the groups that received Monensin or the Control showed an increase in the Shannon index when challenged, the group that received the additive Blend did not differ between challenged and non-challenged (S2 Table 2).

To analyze the inter-individual differences, the Bray Curtis dissimilarity index (CB) was used and showed that the microbial composition of the different samples differed (Adonis with 999 permutations, $p = 0.002$). Despite the lack of homogeneity in the dispersion, the PCoA graph (Fig 2) based on the Bray-Curtis dissimilarity matrix showed that the microbial population of the challenged animals that received the additives was presented in clusters closer than in the Control treatment.

Fig 2. Principal coordinate analysis (PCoA) of beta diversity based on Bray-Curtis dissimilarity of the experiment composed of three feed additives, basal diet (Control),

sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis. (A) Comparison between Mone and Control treatments (Adonis with 999 permutations, $p = 0.002$). (B) Comparison between Blend and Control treatments (Adonis with 999 permutations, $p = 0.252$). (C) Comparison between Mone, Blend, and Control treatments challenges with coccidiosis (Adonis with 999 permutations, $p = 0.179$). (D) Between all treatments (Adonis with 999 permutations, $p = 0.002$).

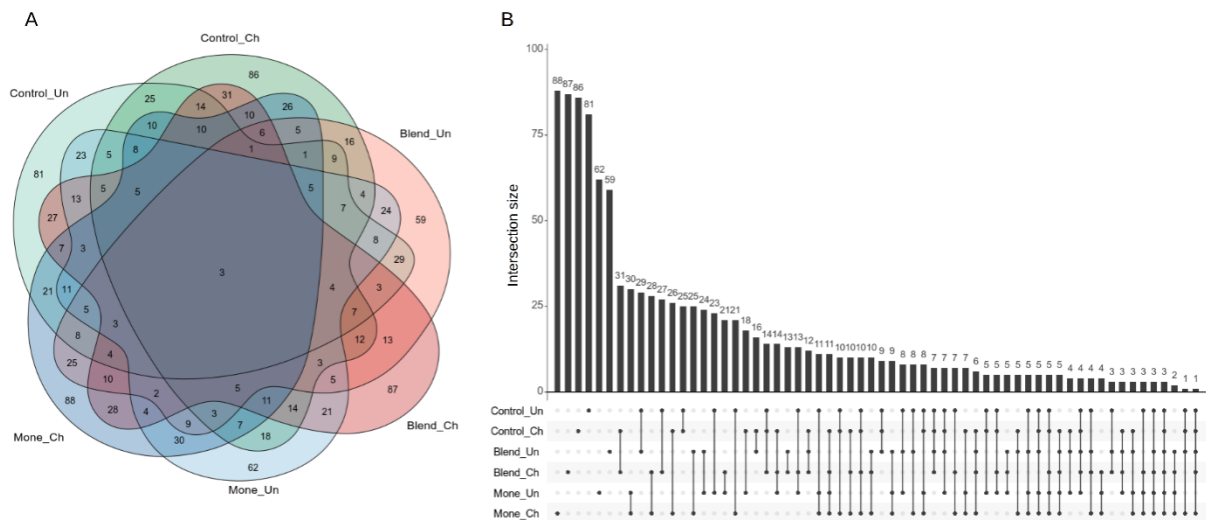


Shared and unique microbial populations

To investigate the microbial community, a paired comparison of the microbial similarity among treatments was conducted, as well as an analysis of common ASVs, shown in the Venn diagram. Shared ASVs are those present in at least 30% of each treatment sample compared, and unique ASVs were defined as those present only in more than 30% of a sample of each treatment and absent in the other 5 treatments. A total of 3 ASVs were shared by the 6 treatments, while the number of ASVs presented in only one treatment ranged from 59 to 88.

More ASVs (67 and 357) were shared by additives and challenged, respectively, and the single ASVs were higher than 80, except 59 and 62 for the treatments in which the chickens received additives and were not challenged, Blend and Monensina, respectively (Fig 3).

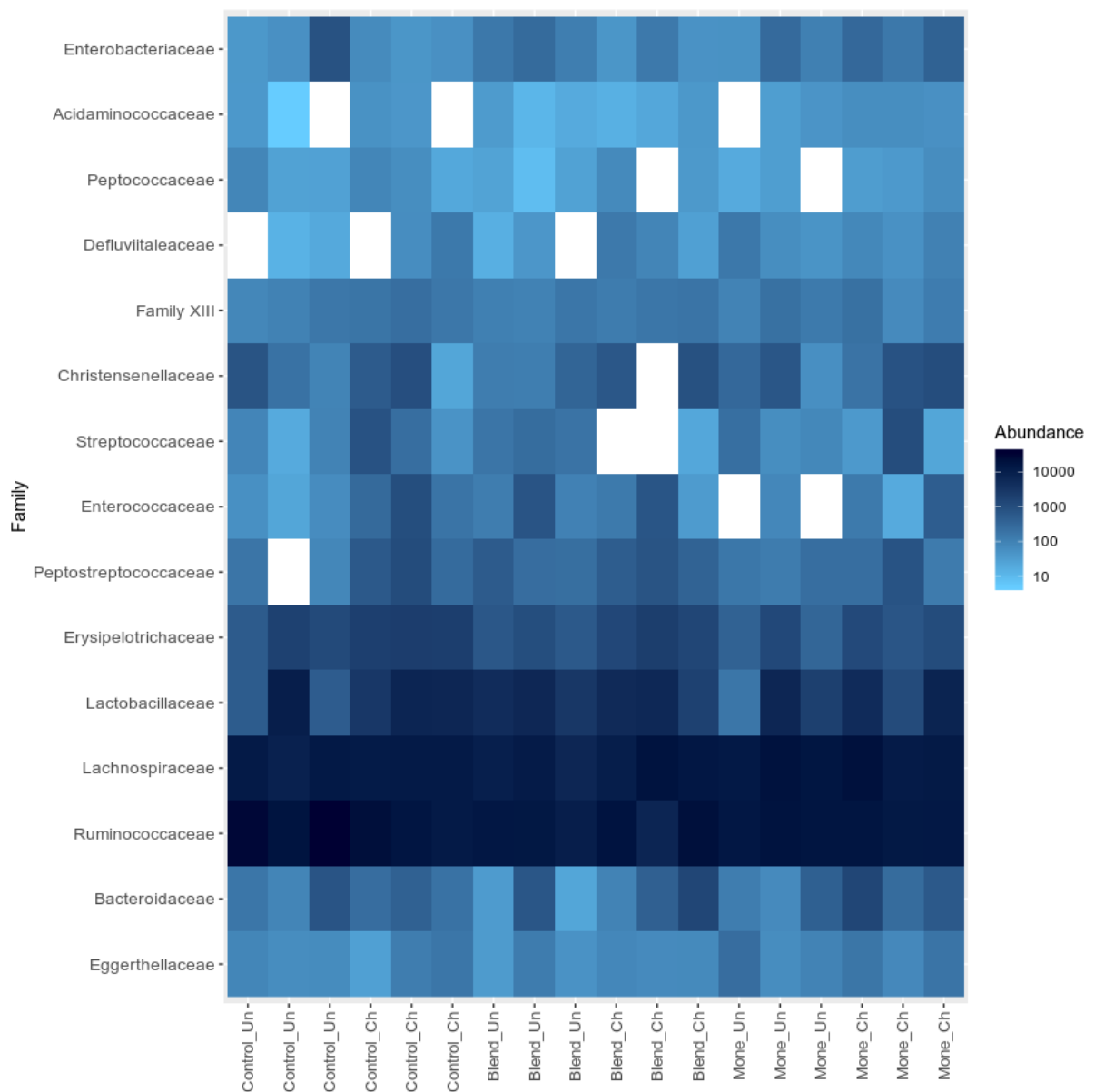
Fig 3. ASVs shared or unshared by the six treatments composed of three feed additives, basal diet (Control), sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis.



In Fig 4 it was possible to observe that the dominance among the samples was for the families Ruminococacea and Lachnospiraceae, followed by Lactobalillaceae Bacteroidaceae and Erysipelotrichaceae. A complete list of the sequences identified (relative abundance) by treatment and challenged is provided in S3 Table 3. All sequences were classified into 7 phyla, although 3 phyla were more common (> 1%): Firmicutes, Bacteroidetes and Tenericutes (Fig 3). Firmicutes was the most abundant phylum in all treatments, regardless of the challenge (> 91%). However, birds that received Monensin and were challenge showed a reduction in this phylum (97.05 vc 94.07) and increased Bacteroidetes and Verrumicrobia, decreasing Tenericutes.

At the class level, Clostridia was the most abundant class > 75% among the sequences of the 18 samples, regardless of the additive; the challenged broilers showed lower levels of this class, except for those that received Blend in the diet (Fig 4). Contrary to what happened in the Clostridia class, in the Bacili class there was an increase in abundance when the broilers were challenged, with the exception of the group that received the Blend.

Fig 4. Microbial distribution of the eighteen samples.

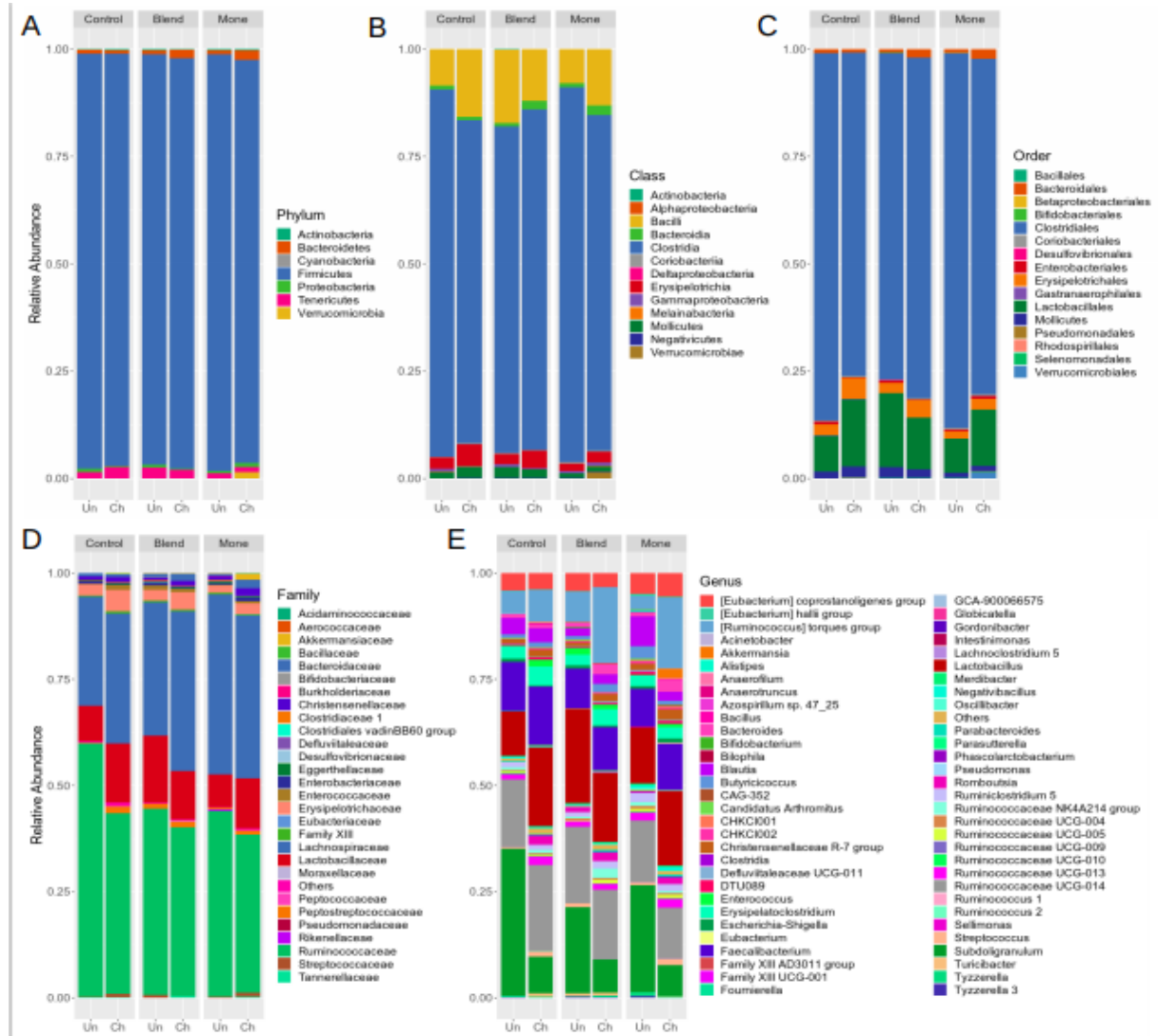


Heatmap based on the hierarchical clustering solution (Bray–Curtis distance metric and complete clustering method) of the eighteen samples. Rows represent the 15 predominant bacterial families. Columns represent the eighteen samples, and the values in the heatmap represent the abundance transformed in log10 of each bacterial family, indicated at the right side of the figure.

An increase in Bacteroidia (~ 0.80% vs ~ 2.05) was observed for the challenged groups that received Blend and Monensina. For Erysipelotrichia and Mollicutes, regardless of the treatment, there was an increase in the abundance of these classes when broilers were challenged, with the exception of the treatment receiving the Blend which reduce the Mollicutes class. The class Melainabacteria was identified in low abundance (<0.1%) only in the challenged animals and those belonging to the Control group not challenged.

Thirty families were identified, in which 7 had relative abundance > 1% (Fig 5). The Ruminococcaceae family was predominant in all groups (> 31%), mainly in non-challenged animals, and lower percentages were found in the groups that received Blend and Monensin. The Lechnospiraceae family had the second highest abundance (> 25%). Broilers challenged that received Blend or Monensin showed similar abundance (~ 37%). Lactobacillaceae showed higher indexes in challenged broilers (> 11%), except for the treatment with Blend (15.06% vs 11.64%, unchallenged and challenged, respectively). The challenged broilers increased the abundance of the Erysipelotrichaceae family. Bacteroidaceae was observed in a higher percentage in the Monensina and Blend groups (> 1.5%) when broilers were challenged. Streptococaceae showed a significant increase in challenged broilers that received Monensin (1.16%) and, conversely, a visible reduction when using Blend (~0.02%).

Fig 5. The relative abundance of broilers gut microbiota treat with three feed additives, basal diet (Control), sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis.



Relative abundance is presented in percentage (%) of bacteria at (A) Phylum, (B) Class, (C) Order, (D) Family, and (E) Genus levels. Minor bacterial genera including unassigned values were included as “others”.

Discussion

The commercial blend of cashew nut liquid and castor oil modulated the inflammatory response against *Eimeria spp.* In the absence of the parasite, there was no

stimulation of genes involved in the inflammatory response, demonstrating that the blend is an effective tool in specifically modulating the immune system of birds afflicted with coccidiosis [26]. The monensin and CNSL-Castor oil effectively minimized the impact of coccidiosis at different times. While monensin acts as an antimicrobial, CNSL-Castor oil modulates the intestinal microbiota with antimicrobial action against gram-positive bacteria, mainly *C. perfringens* and *S. aureus* [27]. In general, the Blend improved the performance of the challenged animals in the second week after the challenge, resulting in a similar performance to the ionophore Monensin. It seems while Monensin acts directly against the parasite, Blend acts as a modulator of the immune system and intestinal microbiota of birds.

Intestinal health is directly related to the profile of the microbiota that interacts with the host. The microbiota regulates absorption efficiency, antagonizes the effects of pathogenic bacteria, improves intestinal integrity and modulates immunity [28,29]. The challenge of coccidiosis leads to changes in nutrient absorption and digestibility, with increased mucogenesis and membrane permeability, increasing the availability of nutrients and thus the proliferation of pathogenic bacteria[1,29,30].

In this study, the coccidiosis challenge increased the microbiota's biodiversity contrarily to the reported by Zhou et al. [5] and Bortoluzzi et al.[31] . However, the Blend modulated this change, maintaining the index values closer between challenged and unchallenged animals, compared to the Control and Monensin treatments. When analyzed via PCR-rt, after the challenge the Blend maintained the bacterium domain (total number of bacteria), while the Monensin reduced [27].

The Firmicutes phylum is predominant in the gut of poultry[8,32,33]. In this study, a decrease in the frequency of firmicutes and an increase in Bacteroidetes in challenged birds was observed. In situations of dysbiosis, such as caused by coccidiosis, some genera of Bacteroidetes can proliferate and become pathogenic, and as a consequence reduce feeding

efficiency of birds[34]. In humans, weight loss is related to the imbalance in the Firmicutes: Bacteroidetes ratio in the intestinal microbiota, with a decrease in the Firmicutes and an increase in the Bacteroidetes, while the opposite was observed in obese rats [35].

The proliferation of *Lactobacillus spp.* was stimulated by the *Eimeria spp.*, challenge which is in agreement with the results found by Kley et al., [36], M'sadeq et al.,[37], Stanley et al., [3]. Several species of *Lactobacillus* have been associated with beneficial properties to the host, positively contributing to broiler weight gain, reducing injury scores, inhibiting cell invasion and increased mucosal [38-40]. The increase in this family in our study may be related to the triggering of an immunomodulatory response by *Lactobacillus, spp.* facing the challenge. Because it has been demonstrated that many species of *Lactobacillus* act in the innate and acquired system stimulating immune cells to release pro-inflammatory cytokines as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-12 (IL-12) (Christensen et al. 2002; Cross 2002; Maassen et al. 2000; Nagafuchi et al. 1999; Perdigon et al. 1999) [41-45].

The Aerococaceae family, another member of the phylum Firmicutes, was observed only in the group supplemented with Blend challenged or not. This family is among the main bacteria producing lactic acid [46,47], reducing the pH of the gastrointestinal tract and acting as an important tool to inhibit pathogenic bacteria. Peptostreptococaceae is another important group of bacteria that produce butyric acid [48,49]. This acid is associated with better nutrient absorption[50], stimulating the growth of intestinal mucosa cells, improving the retention of calcium and phosphorus in the diet, mitigating coccidiosis challenge [5] and is an important energy source for enterocytes [51,52]. The use of Blend kept this population stable with the challenge, while the other treatments reduced the population. The Blend also maintained stable the Akkermansiaceae family. Bacteria of the genus *Akkermansia spp.* can use mucus as a source of carbon and nitrogen, producing acetate and propionate, providing

better intestinal health, with an inverse correlation between their relative abundance and intestinal disorders [53-55].

Gharib-Naseri et al. [56] reported that birds challenged by necrotic enteritis showed a reduction in the Ruminococcaceae group, and a similar result was found in this study. The families Lachnospiraceae, Ruminococcaceae and Erysipelotrichaceae have a positive correlation with better feed conversion because it is associated with the production of short-chain fatty acids (SCFA) and degradation of plant materials [57,58]. In this study, the use of Blend provided an increase in the Erysipelotrichaceae family, with less variation in the relative abundance between non-challenged and challenged birds. This family was associated with better feed conversion in broilers [59].

In this study it was possible to observe that the non-challenged animals showed a greater relative abundance for the Clostridiaceae family, mainly for Monensin and Blend groups. Within the Clostridiaceae family there are different species, among them *Clostridium butyricum* and *Clostridium perfringens*. The *C. butyricum* can produce short-chain fatty acids (e.g., butyric acid) and has been studied as a probiotic to broilers improving intestine barrier function and inhibiting pathogens (Yang et al., 2012). Huang et al. (2019) observed that *C. butyricum* decreased the abundance of *C. perfringens* in the gut during the development of necrotic enteritis in broilers. The *Clostridium perfringens* is the most important pathogenic strain capable of producing more than 16 toxins with different modes of action [60]. Among the toxins, the alpha toxin is responsible for hemolysis, tissue necrosis, epithelial barrier dysfunction and severe inflammation, and, as consequence, causes rapid loss of performance and high mortality [61-63]. Eimeria infection causes damage to enterocytes, releasing cellular protein and stimulating mucogenesis, which creates a favorable environment for the reproduction of *C. perfringens* [61,63,64]. In this study using the qRT-PCR technique,

it was demonstrated that supplementation with Blend reduced ($P < 0.05$) the number of copies of *C. perfringens* species compared to the Monensin and Control groups [27].

The use of antimicrobials, including Monensin, can delay the maturation of the intestinal microbiota and, as a consequence, significantly affect the intestinal immune system bird's development and negatively impacts animal's health [65,66]. Monensin, when used alone, causes *Lactobacillus* and *Enterococcus* depletion, and when Monensin is associated with other antimicrobials it results in an increase in *Escherichia coli* population [8]. Some studies report that antimicrobials can reduce microbial diversity in the intestine, with a tendency to increase producing butyrate and lactic acid bacteria. In contrast, they reduce bile salt-producing bacteria, responsible for the use of carbohydrates and lipids in the diet and better energy balance [65-67]

The use of the Blend kept the intestinal microbiota more stable, mitigating the impacts of *Eimeria spp* challenge. It acted as a modulator, mainly for gram-positive bacteria, fact that contributed to a better weight gain and feed conversion rate ($P > 0.05$) after 14 days of the challenge [26]. The relationship between the immune system and the microbiota is complex, so two hypotheses were created for the Blend's mechanism of action in intestinal health. The first hypothesis is that it acts as a modulator of the intestinal microbiota and these bacteria modulate the gene expression of interleukins, toll-like receptors and T cells during the parasite's infectious process. The second hypothesis is that Blend acts on the immune system during the peak of the inflammatory process caused by the challenge, directing the response against pathogenic bacteria and modulating the microbiota.

Conclusions

The functional oils blend, in addition to stimulate the beneficial microbiota, mitigated the impact on the microbiome of broilers challenged by coccidiosis, which resulted

in greater stability in the microbial structure when compared to the ionophore Monensin. The Blend proved to be a good option in the challenge by coccidiosis.

Acknowledgments

The authors acknowledge Joan Torrent (Oligo Basics Ind. Ltda., Cascavel, Paraná, Brazil) for providing the cashew nut shell oil and castor oil blend commercial).

References

- [1] KIARIE, E., ROMERO, L. F. & NYACHOTI, C. M. 2013. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. *Nutrition research reviews*, 26, 71-88.
- [2] OAKLEY, B. B., LILLEHOJ, H. S., KOGUT, M. H., KIM, W. K., MAURER, J. J., PEDROSO, A., LEE, M. D., COLLETT, S. R., JOHNSON, T. J. & COX, N. A. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS microbiology letters*, 360, 100-112.
- [3] STANLEY, D., WU, S.-B., RODGERS, N., SWICK, R. A. & MOORE, R. J. 2014. Differential responses of cecal microbiota to fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a necrotic enteritis challenge model in chickens. *PloS one*, 9.
- [4] WU, S.-B., STANLEY, D., RODGERS, N., SWICK, R. A. & MOORE, R. J. 2014. Two necrotic enteritis predisposing factors, dietary fishmeal and *Eimeria* infection, induce large changes in the caecal microbiota of broiler chickens. *Veterinary microbiology*, 169, 188-197.
- [5] ZHOU, Z., NIE, K., HUANG, Q., LI, K., SUN, Y., ZHOU, R., WANG, Z. & HU, S. 2017. Changes of cecal microflora in chickens following *Eimeria tenella* challenge and regulating effect of coated sodium butyrate. *Experimental parasitology*, 177, 73-81.
- [6] NOACK, S., CHAPMAN, H. D. & SELZER, P. M. 2019. Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitology research*, 118, 2009-2026.

- [7] LU, J., HOFACRE, C. & LEE, M. 2006. Emerging technologies in microbial ecology aid in understanding the effect of monensin in the diets of broilers in regard to the complex disease necrotic enteritis. *Journal of applied poultry research*, 15, 145-153.
- [8] DANZEISEN, J. L., KIM, H. B., ISAACSON, R. E., TU, Z. J. & JOHNSON, T. J. 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PloS one*, 6.
- [9] CHAPMAN, H., JEFFERS, T. & WILLIAMS, R. 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry science*, 89, 1788-1801.
- [10] UPADHAYA, S. D. & KIM, I. H. 2017. Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals—a review. *Annals of Animal Science*, 17, 929-948.
- [11] GADDE, U., KIM, W., OH, S. & LILLEHOJ, H. S. 2017. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, 18, 26-45.
- [12] ABUDABOS, A. M., ALYEMNI, A. H., DAFALLA, Y. M. & KHAN, R. U. 2018. The effect of phytogenics on growth traits, blood biochemical and intestinal histology in broiler chickens exposed to *Clostridium perfringens* challenge. *Journal of applied animal research*, 46, 691-695.
- [13] 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.
- [14] APPLGATE, T., KLOSE, V., STEINER, T., GANNER, A. & SCHATZMAYR, G. 2010. Probiotics and phytogenics for poultry: Myth or reality? *Journal of Applied Poultry Research*, 19, 194-210.

- [15] MURAKAMI, A., EYNG, C. & TORRENT, J. 2014. Effects of functional oils on coccidiosis and apparent metabolizable energy in broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27, 981.
- [16] ROSTAGNO, H. S. 2000. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
- [17] CHRISTOFF, A., SEREIA, A., BOBERG, D., MORAES, R. & OLIVEIRA, L. 2017. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies*, 25.
- [18] BOLYEN, E., RIDEOUT, J. R., DILLON, M. R., BOKULICH, N. A., ABNET, C. C., AL-GHALITH, G. A., ALEXANDER, H., ALM, E. J., ARUMUGAM, M. & ASNICAR, F. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37, 852-857.
- [19] WICKHAM, H. 2007. Reshaping data with the reshape package. *Journal of statistical software*, 21, 1-20.
- [20] WICKHAM, H. 2011. The split-apply-combine strategy for data analysis. *Journal of Statistical Software*, 40, 1-29.
- [21] MCMURDIE, P. J. & HOLMES, S. 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8.
- [22] OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P., O'HARA, R., SIMPSON, G., SOLYMOS, P., STEVENS, M. & WAGNER, H. 2011. Community ecology package. R package version 2.0-2.
- [23] PERRY, M. 2019. Heatmaps: Flexible heatmaps for functional genomics and sequence features. R package version 1.0. 0.
- [24] DUSA, A. 2018. Package venn: Draw Venn Diagrams. R package version 1.7.

- [25] GEHLENBORG, N. 2016. UpSetR: A More Scalable Alternative to Venn and Euler Diagrams for Visualizing Intersecting Sets. R package version 1.4.0.
- [26] MORAES, P., ANDRETTA, I., CARDINAL, K., CERON, M., VILELLA, L., BORILLE, R., FRAZZON, A., FRAZZON, J., SANTIN, E. & RIBEIRO, A. 2019b. Effect of functional oils on the immune response of broilers challenged with *Eimeria* spp. *animal*, 13, 2190-2198.
- [27] MORAES, P., CARDINAL, K., GOUVÊA, F., SCHROEDER, B., CERON, M., LUNEDO, R., FRAZZON, A., FRAZZON, J. & RIBEIRO, A. 2019a. Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. *Poultry science*, 98, 5456-5464.
- [28] OVIEDO-RONDÓN, E. O., HUME, M. E., BARBOSA, N. A., SAKOMURA, N. K., WEBER, G. & WILSON, J. W. 2010. Ileal and caecal microbial populations in broilers given specific essential oil blends and probiotics in two consecutive grow-outs. *Avian Biology Research*, 3, 157-169.
- [29] PAN, D. & YU, Z. 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut microbes*, 5, 108-119.
- [30] HAUCK, R. 2017. Interactions between parasites and the bacterial microbiota of chickens. *Avian diseases*, 61, 428-436.
- [31] BORTOLUZZI, C., SCAPINI, L., RIBEIRO, M., PIVETTA, M., BUZIM, R. & FERNANDES, J. 2019. Effects of β -mannanase supplementation on the intestinal microbiota composition of broiler chickens challenged with a coccidiosis vaccine. *Livestock Science*, 228, 187-194.
- [32] WANG, L., LILBURN, M. & YU, Z. 2016. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. *Frontiers in microbiology*, 7, 593.

- [33] HOU, Q., KWOK, L.-Y., ZHENG, Y., WANG, L., GUO, Z., ZHANG, J., HUANG, W., WANG, Y., LENG, L. & LI, H. 2016. Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits. *Scientific reports*, 6, 37376.
- [34] BETANCOURT, L., HUME, M., RODRÍGUEZ, F., NISBET, D., SOHAIL, M. U. & AFANADOR-TELLEZ, G. 2019. Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. *Poultry science*, 98, 4777-4786.
- [35] LEY, R., TURNBAUGH, P., KLEIN, S. & GORDON, J. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023.
- [36] KLEY, M.-V., OVIEDO-RONDON, E., DOWD, S., HUME, M. & NALIAN, A. 2012. Effect of *Eimeria* infection on cecal microbiome of broilers fed essential oils.
- [37] M'SADEQ, S. A., WU, S.-B., SWICK, R. A. & CHOCT, M. 2015. Dietary acylated starch improves performance and gut health in necrotic enteritis challenged broilers. *Poultry science*, 94, 2434-2444.
- [38] QING, X., ZENG, D., WANG, H., NI, X., LIU, L., LAI, J., KHALIQUE, A., PAN, K. & JING, B. 2017. Preventing subclinical necrotic enteritis through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by ameliorating lipid metabolism and intestinal microflora in broiler chickens. *Amb Express*, 7, 139.
- [39] DALLOUL, R., LILLEHOJ, H., SHELLEM, T. & DOERR, J. 2003. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. *Poultry science*, 82, 62-66.
- [40] GIANNENAS, I., PAPADOPOULOS, E., TSALIE, E., TRIANTAFILLOU, E., HENIKL, S., TEICHMANN, K. & TONTIS, D. 2012. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary parasitology*, 188, 31-40.

- [41] CHRISTENSEN, H. R., FRØKIÆR, H. & PESTKA, J. J. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 168, 171-178.
- [42] CROSS, M. L., MORTENSEN, R. R., KUDSK, J. & GILL, H. S. 2002. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Medical microbiology and immunology*, 191, 49-53.
- [43] MAASSEN, C. B., VAN HOLTEN-NEELEN, C., BALK, F., DEN BAK-GLASHOUWER, M.-J. H., LEER, R. J., LAMAN, J. D., BOERSMA, W. J. & CLAASSEN, E. 2000. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, 18, 2613-2623.
- [44] NAGAFUCHI, S., TAKAHASHI, T., YAJIMA, T., KUWATA, T., HIRAYAMA, K. & ITOH, K. 1999. Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63, 474-479.
- [45] PERDIGON, G., VINTINI, E., ALVAREZ, S., MEDINA, M. & MEDICI, M. 1999. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 82, 1108-1114.
- [46] AXELSSON, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 139, 1-66.
- [47] VOS, P., GARRITY, G., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., SCHLEIFER, K.-H. & WHITMAN, W. B. 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3, 2 Ed.* New York: The Firmicutes, Springer Science & Business Media.
- [48] HANG, I., RINTTILA, T., ZENTEK, J., KETTUNEN, A., ALAJA, S., APAJALAHTI, J., HARMOINEN, J., DE VOS, W. M. & SPILLMANN, T. 2012. Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC veterinary research*, 8, 90.

- [49] GEIRNAERT, A., WANG, J., TINCK, M., STEYAERT, A., VAN ABBEELE, P., EECKHAUT, V., VILCHEZ-VARGAS, R., FALONY, G., LAUKENS, D. & DE VOS, M. 2015. Interindividual differences in response to treatment with butyrate-producing *Butyricoccus pullicaecorum* 25–3T studied in an in vitro gut model. *FEMS microbiology ecology*, 91.
- [50] WHITEHEAD, R., YOUNG, G. & BHATHAL, P. 1986. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut*, 27, 1457-1463.
- [51] DIBNER, J. & BUTTIN, P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*, 11, 453-463.
- [52] ONRUST, L., DUCATELLE, R., VAN DRIESSCHE, K., DE MAESSCHALCK, C., VERMEULEN, K., HAESEBROUCK, F., EECKHAUT, V. & VAN IMMERSEEL, F. 2015. Steering endogenous butyrate production in the intestinal tract of broilers as a tool to improve gut health. *Frontiers in veterinary science*, 2, 75.
- [53] PNG, C. W., LINDÉN, S. K., GILSHENAN, K. S., ZOETENDAL, E. G., MCSWEENEY, C. S., SLY, L. I., MCGUCKIN, M. A. & FLORIN, T. H. 2010. Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria. *American Journal of Gastroenterology*, 105, 2420-2428.
- [54] SWIDSINSKI, A., DÖRFFEL, Y., LOENING-BAUCKE, V., THEISSIG, F., RÜCKERT, J. C., ISMAIL, M., RAU, W. A., GASCHLER, D., WEIZENEGGER, M. & KÜHN, S. 2011. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*, 60, 34-40.
- [55] FUJIO-VEJAR, S., VASQUEZ, Y., MORALES, P., MAGNE, F., VERA-WOLF, P., UGALDE, J. A., NAVARRETE, P. & GOTTELAND, M. 2017. The gut microbiota of

healthy chilean subjects reveals a high abundance of the phylum verrucomicrobia. *Frontiers in microbiology*, 8, 1221.

[56] GHARIB-NASERI, K., KHERAVII, S., KEERQIN, C., MORGAN, N., SWICK, R., CHOCT, M. & WU, S. 2019. Two different *Clostridium perfringens* strains produce different levels of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry science*, 98, 6422-6432.

[57] BIDDLE, A., STEWART, L., BLANCHARD, J. & LESCHINE, S. 2013. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5, 627-640.

[58] STANLEY, D., DENMAN, S. E., HUGHES, R. J., GEIER, M. S., CROWLEY, T. M., CHEN, H., HARING, V. R. & MOORE, R. J. 2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1361-1369.

[59] STANLEY, D., HUGHES, R. J., GEIER, M. S. & MOORE, R. J. 2016. Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 7, 187.

[60] UZAL, F. A., FREEDMAN, J. C., SHRESTHA, A., THEORET, J. R., GARCIA, J., AWAD, M. M., ADAMS, V., MOORE, R. J., ROOD, J. I. & MCCLANE, B. A. 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future microbiology*, 9, 361-377.

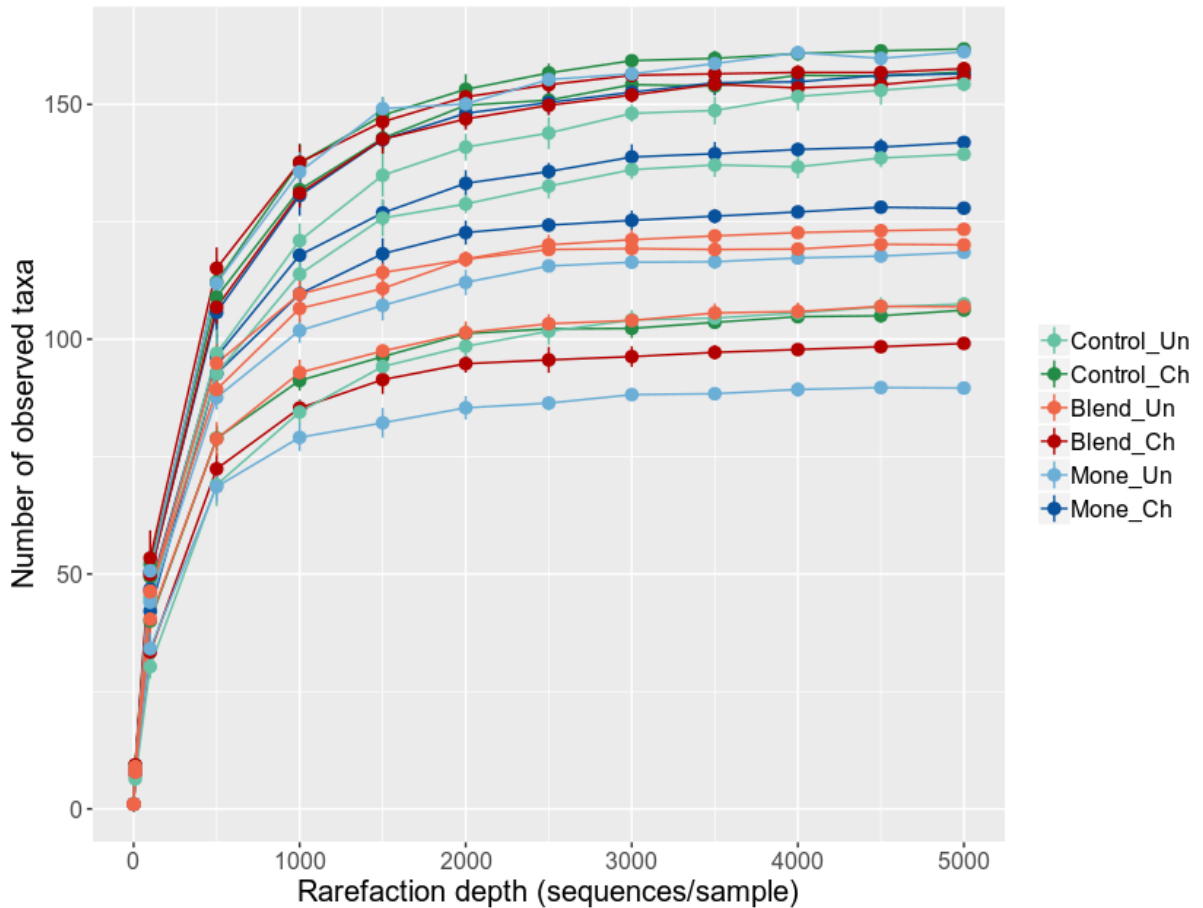
[61] NEISH, A. S., GEWIRTZ, A. T., ZENG, H., YOUNG, A. N., HOBERT, M. E., KARMALI, V., RAO, A. S. & MADARA, J. L. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science*, 289, 1560-1563.

[62] XAVIER, R. J. & PODOLSKY, D. K. 2000. How to get along--friendly microbes in a hostile world. *Science*, 289, 1483-1484.

- [63] LATORRE, J. D., ADHIKARI, B., PARK, S. H., TEAGUE, K. D., GRAHAM, L. E., MAHAFFEY, B. D., BAXTER, M. F., HERNANDEZ-VELASCO, X., KWON, Y. M. & RICKE, S. C. 2018. Evaluation of the epithelial barrier function and ileal microbiome in an established necrotic enteritis challenge model in broiler chickens. *Frontiers in veterinary science*, 5, 199.
- [64] HERNANDEZ-PATLAN, D., SOLIS-CRUZ, B., PONTIN, K. P., HERNANDEZ, X., MERINO-GUZMAN, R., ADHIKARI, B., LÓPEZ-ARELLANO, R., KWON, Y. M., HARGIS, B. M. & ARREGUIN-NAVA, M. 2019. Impact of a *Bacillus* direct-fed microbial on growth performance, intestinal barrier integrity, necrotic enteritis lesions and ileal microbiota in broiler chickens using a laboratory challenge model. *Frontiers in veterinary science*, 6, 108.
- [65] GAO, P., MA, C., SUN, Z., WANG, L., HUANG, S., SU, X., XU, J. & ZHANG, H. 2017. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 5, 91.
- [66] MAKI, J. J., KLIMA, C. L., SYLTE, M. J. & LOOFT, T. 2019. The Microbial Pecking Order: Utilization of Intestinal Microbiota for Poultry Health. *Microorganisms*, 7, 376.
- [67] ROBINSON, K., BECKER, S., XIAO, Y., LYU, W., YANG, Q., ZHU, H., YANG, H., ZHAO, J. & ZHANG, G. 2019. Differential Impact of Subtherapeutic Antibiotics and Ionophores on Intestinal Microbiota of Broilers. *Microorganisms*, 7, 282.

Supporting information

S1 Fig 1. Rarefaction curve of the eighteen samples of the experiment composed of three feed additives, basal diet (control), sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis.



Horizontal axis: the amount of effective sequencing data (rarefaction depth); vertical axis: the observed number of variations of sequence amplification (ASVs).

S1 Table 1. The number of reads that passed through each step of the quality control for the eighteen samples of the experiment composed of three feed additives, basal diet (control), sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis.

Samples	Input	Filtered	Denoised	Non-chimeric	Non-rare
Control_Ch	49908	45378	45378	45168	44640

Control_Ch	51289	47093	47093	46318	45544
Control_Ch	41824	37939	37939	37939	37390
Mone_Ch	55928	51536	51536	49683	48936
Mone_Ch	37923	34977	34977	32834	31974
Mone_Ch	48632	43428	43428	43409	42635
Blend_Ch	47474	43545	43545	39758	39167
Blend_Ch	45298	41315	41315	39115	38248
Blend_Ch	53148	48911	48911	46218	45368
Control_Un	52792	48679	48679	46867	46374
Control_Un	47686	42676	42676	42350	41595
Control_Un	63005	57993	57993	54091	53276
Mone_Un	33988	31341	31341	31096	30901
Mone_Un	58916	52625	52625	50611	49749
Mone_Un	42404	38753	38753	38691	38329
Blend_Un	37861	34508	34508	34181	33792
Blend_Un	43041	39348	39348	38370	37692
Blend_Un	25672	23435	23435	23409	22852
Total					728,462
Average					40,470.11
SD					7,580.40

S2 Table 2. Alpha diversity of the intestinal microbiota of broilers at the family level. The experiment is composed of three feed additives, basal diet (control), sodium Monensin (Mone), or Blend (Blend) and sanitary challenge (CH) or unchallenged (UN) with coccidiosis.

Treatment	Chao1	Shannon	Simpson
Control_Ch	20.00 ± 2.65	1.50 ± 0.13	0.70 ± 0.05
Control_Un	18.00 ± 1.73	1.09 ± 0.19	0.56 ± 0.10
Blend_Ch	18.33 ± 1.53	1.39 ± 0.07	0.66 ± 0.02
Blend_Un	19.00 ± 3.46	1.42 ± 0.08	0.68 ± 0.02
Mone_Ch	20.67 ± 3.06	1.50 ± 0.17	0.69 ± 0.05
Mone_Un	19.00 ± 2.65	1.19 ± 0.15	0.61 ± 0.05
<i>p</i> value	0.714	0.040	0.399
chi-squared	2.909	11.667	5.140

Chao = number of families present in the samples. Shannon = abundance and evenness of the families present in the samples. Simpson = number and abundance of each family present. *p* values lower than 0.05 imply significant differences by non-parametric Kruskal-walis test. Values are means and standard deviation of 3 replicates and a pool of 8 birds/replicate.

S3 Table 3. Relative abundance of phylum, class, order, family, and genera present in the gut microbiota of broilers.

Phylum	Control_Ch	Mone_Ch	Blend_Ch	Control_Un	Mone_Un	Blend_Un	chi-squared	p value
Actinobacteria	0,26±0,20	0,34±0,10	0,18±0,02	0,15±0,03	0,39±0,35	0,33±0,28	4,42	0,49
Bacteroidetes	0,80±0,22	2,02±1,48	1,92±1,59	0,88±0,64	0,87±0,56	0,71±0,99	4,13	0,53
Cyanobacteria	0,04±0,07	0,03±0,05	0,02±0,03	0,07±0,13	-	-	2,49	0,78
Firmicutes	96,00±0,64	94,07±2,87	95,64±2,28	96,59±0,32	97,05±1,56	95,63±0,51	4,84	0,44
Proteobacteria	0,28±0,24	0,84±0,43	0,23±0,18	0,65±0,85	0,52±0,17	0,64±0,26	7,08	0,21
Tenericutes	2,51±0,63	1,30±0,20	1,91±1,48	1,60±1,21	1,10±1,17	2,60±1,72	4,16	0,53
Verrucomicrobia	0,10±0,13	1,41±2,37	0,10±0,16	0,01±0,01	0,07±0,10	0,10±0,17	2,75	0,74
Unknown	-	-	-	0,05±0,08	-	-	5,00	0,42
Class								
Actinobacteria	-	-	-	-	-	0,10±0,17	5,00	0,42
Coriobacteriia	0,26±0,20	0,34±0,10	0,18±0,02	0,15±0,03	0,39±0,35	0,23±0,12	5,12	0,40
Bacteroidia	0,80±0,22	2,02±1,48	1,92±1,59	0,88±0,64	0,87±0,56	0,71±0,99	4,13	0,53
Melainabacteria	0,04±0,07	0,03±0,05	0,02±0,03	0,07±0,13	-	-	2,49	0,78
Bacilli	15,84±5,73	12,72±6,54	12,49±7,39	9,40±13,92	6,94±6,57	16,70±3,03	4,30	0,51
Clostridia	75,08±6,38	78,74±9,53	78,95±6,32	84,50±15,28	88,43±7,51	76,40±3,17	4,86	0,43
Erysipelotrichia	5,01±0,59	2,46±0,20	4,13±1,30	2,65±1,67	1,61±0,91	2,45±0,40	10,73	0,06
Negativicutes	0,07±0,06	0,15±0,04	0,06±0,03	0,03±0,05	0,06±0,06	0,07±0,04	8,19	0,15
Alphaproteobacteria	0,06±0,10	-	-	-	-	-	5,00	0,42
Deltaproteobacteria	-	-	-	-	0,04±0,04	0,02±0,04	7,86	0,16
Gammaproteobacteria	0,23±0,13	0,84±0,43	0,23±0,18	0,65±0,85	0,47±0,19	0,62±0,22	9,28	0,10
Mollicutes	2,51±0,63	1,30±0,20	1,91±1,48	1,60±1,21	1,10±1,17	2,60±1,72	4,16	0,53
Verrucomicrobiae	0,10±0,13	1,41±2,37	0,10±0,16	0,01±0,01	0,07±0,10	0,10±0,17	2,75	0,74
Unknown	-	-	-	0,05±0,08	-	-	5,00	0,42
Order								
Bifidobacteriales	-	-	-	-	-	0,10±0,17	5,00	0,42
Coriobacteriales	0,26±0,20	0,34±0,10	0,18±0,02	0,15±0,03	0,39±0,35	0,23±0,12	5,12	0,40
Bacteroidales	0,80±0,22	2,02±1,48	1,92±1,59	0,88±0,64	0,87±0,56	0,71±0,99	4,13	0,53

Gastranaerophilales	0,04±0,07	0,03±0,05	0,02±0,03	0,07±0,13	-	-	2,49	0,78
Bacillales	0,05±0,09	0,04±0,07	0,02±0,03	0,04±0,06	-	-	2,49	0,78
Lactobacillales	15,79±5,82	12,68±6,47	12,48±7,43	9,36±13,85	6,94±6,57	16,70±3,03	4,30	0,51
Clostridiales	75,08±6,38	78,74±9,53	78,95±6,32	84,50±15,28	88,43±7,51	76,40±3,17	4,86	0,43
Erysipelotrichales	5,01±0,59	2,46±0,20	4,13±1,30	2,65±1,67	1,61±0,91	2,45±0,40	10,73	0,06
Selenomonadales	0,07±0,06	0,15±0,04	0,06±0,03	0,03±0,05	0,06±0,06	0,07±0,04	8,19	0,15
Rhodospirillales	0,06±0,10	-	-	-	-	-	5,00	0,42
Desulfovibrionales	-	-	-	-	0,04±0,04	0,02±0,04	7,86	0,16
Betaproteobacteriales	-	0,04±0,07	-	0,01±0,02	0,08±0,09	-	6,43	0,27
Enterobacteriales	0,13±0,03	0,69±0,24	0,21±0,16	0,61±0,86	0,34±0,20	0,57±0,15	8,35	0,14
Pseudomonadales	0,09±0,12	0,11±0,13	0,03±0,03	0,03±0,03	0,05±0,05	0,05±0,08	1,77	0,88
Mollicutes RF39	2,51±0,63	1,30±0,20	1,91±1,48	1,60±1,21	1,10±1,17	2,60±1,72	4,16	0,53
Verrucomicrobiales	0,10±0,13	1,41±2,37	0,10±0,16	0,01±0,01	0,07±0,10	0,10±0,17	2,75	0,74
Unknown	-	-	-	0,05±0,08	-	-	5,00	0,42
Family								
Bifidobacteriaceae	-	-	-	-	-	0,10±0,17	5,00	0,42
Eggerthellaceae	0,26±0,20	0,34±0,10	0,18±0,02	0,15±0,03	0,39±0,35	0,23±0,12	5,12	0,40
Bacteroidaceae	0,67±0,22	1,74±1,12	1,53±1,50	0,67±0,66	0,57±0,53	0,67±0,98	3,88	0,57
Rikenellaceae	-	-	-	-	0,25±0,23	0,03±0,04	9,70	0,08
Tannerellaceae	0,13±0,08	0,28±0,36	0,39±0,33	0,22±0,24	0,04±0,08	0,01±0,02	6,64	0,25
Bacillaceae	0,05±0,09	0,04±0,07	0,02±0,03	0,04±0,06	-	-	2,49	0,78
Aerococcaceae	-	-	0,03±0,05	-	-	0,02±0,03	4,25	0,51
Enterococcaceae	1,13±0,96	0,51±0,58	0,78±0,99	0,10±0,04	0,05±0,09	0,95±0,93	10,23	0,07
Lactobacillaceae	13,83±6,39	11,01±7,44	11,64±6,66	9,12±13,97	6,53±6,76	15,06±2,20	3,43	0,63
Streptococcaceae	0,83±0,89	1,16±1,89	0,02±0,03	0,14±0,08	0,36±0,34	0,67±0,16	9,34	0,10
Christensenellaceae	1,16±1,05	1,82±1,25	1,21±1,06	0,77±0,80	0,84±0,63	0,75±0,71	3,01	0,70
Clostridiaceae 1	0,06±0,05	0,04±0,04	0,02±0,02	0,15±0,14	0,21±0,13	0,23±0,40	6,18	0,29
Clostridiales vadinBB60 group	-	0,03±0,05	0,01±0,02	-	-	-	4,25	0,51
Defluviitaleaceae	0,18±0,21	0,19±0,05	0,22±0,15	0,02±0,02	0,25±0,22	0,05±0,06	8,71	0,12
Eubacteriaceae	-	0,10±0,18	-	-	-	0,00±0,01	4,25	0,51
Family XIII	0,45±0,06	0,32±0,11	0,39±0,06	0,24±0,06	0,37±0,06	0,44±0,25	7,53	0,18

Lachnospiraceae	30,32±3,61	37,52±6,14	37,22±12,33	25,26±3,51	42,16±1,75	30,50±1,83	10,33	0,07
Peptococcaceae	0,13±0,07	0,11±0,04	0,09±0,09	0,08±0,07	0,04±0,04	0,07±0,05	4,13	0,53
Peptostreptococcaceae	1,51±0,86	1,10±1,21	1,39±0,59	0,18±0,19	0,47±0,18	1,11±0,51	10,24	0,07
Ruminococcaceae	41,27±8,95	37,50±5,59	38,38±16,74	57,77±11,74	44,08±5,63	43,25±3,73	5,91	0,31
Erysipelotrichaceae	5,01±0,59	2,46±0,20	4,13±1,30	2,65±1,67	1,61±0,91	2,45±0,40	10,73	0,06
Acidaminococcaceae	0,07±0,06	0,15±0,04	0,06±0,03	0,03±0,05	0,06±0,06	0,07±0,04	8,19	0,15
uncultured	0,06±0,10	-	-	-	-	-	5,00	0,42
Desulfovibrionaceae	-	-	-	-	0,04±0,04	0,02±0,04	7,86	0,16
Burkholderiaceae	-	0,04±0,07	-	0,01±0,02	0,08±0,09	-	6,43	0,27
Enterobacteriaceae	0,13±0,03	0,69±0,24	0,21±0,16	0,61±0,86	0,34±0,20	0,57±0,15	8,35	0,14
Moraxellaceae	0,06±0,08	0,07±0,08	0,02±0,03	0,03±0,03	0,04±0,04	-	3,92	0,56
Pseudomonadaceae	0,03±0,04	0,04±0,05	0,01±0,02	-	0,01±0,01	0,05±0,08	3,14	0,68
uncultured bacterium	0,64±0,55	0,38±0,31	0,38±0,47	0,24±0,38	0,02±0,03	0,25±0,35	3,51	0,62
Akkermansiaceae	0,10±0,13	1,41±2,37	0,10±0,16	0,01±0,01	0,07±0,10	0,10±0,17	2,75	0,74
Unknown	1,91±0,55	0,95±0,17	1,55±1,12	1,48±0,93	1,08±1,18	2,35±1,72	3,29	0,66
Genus								
Bifidobacterium	-	-	-	-	-	0,10±0,17	5,00	0,42
CHKCI002	0,22±0,19	0,29±0,06	0,18±0,02	0,11±0,02	0,32±0,30	0,22±0,13	4,25	0,51
Gordonibacter	0,05±0,04	0,06±0,05	-	0,04±0,03	0,08±0,05	0,01±0,01	7,00	0,22
Bacteroides	0,67±0,22	1,74±1,12	1,53±1,50	0,67±0,66	0,57±0,53	0,67±0,98	3,88	0,57
Alistipes	-	-	-	-	0,25±0,23	0,03±0,04	9,70	0,08
Parabacteroides	0,13±0,08	0,28±0,36	0,39±0,33	0,22±0,24	0,04±0,08	0,01±0,02	6,64	0,25
Bacillus	0,05±0,09	0,04±0,07	0,02±0,03	0,04±0,06	-	-	2,49	0,78
Globicatella	-	-	0,03±0,05	-	-	0,02±0,03	4,25	0,51
Enterococcus	1,13±0,96	0,51±0,58	0,78±0,99	0,10±0,04	0,05±0,09	0,95±0,93	10,23	0,07
Lactobacillus	13,83±6,39	11,01±7,44	11,64±6,66	9,12±13,97	6,53±6,76	15,06±2,20	3,43	0,63
Streptococcus	0,83±0,89	1,16±1,89	0,02±0,03	0,14±0,08	0,36±0,34	0,67±0,16	9,34	0,10
Christensenellaceae R-7 group	1,16±1,05	1,82±1,25	1,21±1,06	0,77±0,80	0,84±0,63	0,75±0,71	3,01	0,70
Candidatus Arthromitus	0,06±0,05	0,04±0,04	0,02±0,02	0,11±0,17	0,21±0,13	0,23±0,40	4,82	0,44
uncultured Clostridia bacterium	-	0,03±0,05	0,01±0,02	-	-	-	4,25	0,51
Defluviitaleaceae UCG-011	0,18±0,21	0,19±0,05	0,22±0,15	0,02±0,02	0,25±0,22	0,05±0,06	8,71	0,12

Eubacterium	-	0,10±0,18	-	-	-	0,00±0,01	4,25	0,51
Family XIII AD3011 group	0,12±0,04	0,09±0,03	0,08±0,01	0,03±0,00	-	0,08±0,09	10,92	0,05
Family XIII UCG-001	0,02±0,03	-	0,03±0,03	0,01±0,01	0,02±0,04	-	4,15	0,53
[Eubacterium] hallii group	0,17±0,06	0,21±0,08	0,07±0,12	0,14±0,04	0,30±0,14	0,08±0,14	6,23	0,28
[Ruminococcus] torques group	5,38±0,75	10,79±2,85	12,54±8,07	4,16±0,28	1,62±1,58	4,78±2,18	13,58	0,02
Blautia	2,44±0,56	1,52±0,86	1,62±1,30	2,98±2,68	4,29±3,34	1,29±0,72	4,74	0,45
CHKCI001	0,09±0,15	0,17±0,11	0,08±0,07	0,04±0,03	0,16±0,17	0,04±0,07	4,81	0,44
GCA-900066575	0,06±0,10	0,05±0,08	0,12±0,21	-	-	0,08±0,13	2,49	0,78
Lachnoclostridium 5	0,04±0,06	-	-	-	-	-	5,00	0,42
Sellimonas	-	-	-	0,08±0,14	-	-	5,00	0,42
Tyzzereella	0,17±0,16	0,17±0,16	0,34±0,15	0,29±0,35	0,49±0,54	0,14±0,12	3,22	0,67
Tyzzereella 3	0,08±0,08	-	0,10±0,09	0,13±0,11	0,32±0,22	0,18±0,17	6,92	0,23
Lachnospiraceae_uncultured	-	0,05±0,08	0,12±0,21	-	-	-	4,25	0,51
Peptococcaceae_uncultured	0,13±0,07	0,11±0,04	0,09±0,09	0,10±0,07	0,04±0,04	0,07±0,05	4,13	0,53
Romboutsia	1,51±0,86	1,10±1,21	1,39±0,59	0,03±0,05	0,16±0,18	0,75±0,42	12,33	0,03
[Eubacterium] coprostanoligenes group	2,86±1,11	3,53±1,62	2,22±1,41	3,24±1,65	2,82±1,00	3,14±0,86	1,09	0,95
Anaerofilum	0,09±0,16	0,18±0,31	-	-	-	-	4,25	0,51
Anaerotruncus	0,07±0,08	-	0,11±0,15	-	0,03±0,06	-	7,37	0,19
Butyricoccus	0,90±0,57	0,62±0,25	1,30±0,55	0,71±0,50	1,69±1,01	0,58±0,22	5,51	0,36
CAG-352	0,01±0,01	0,17±0,15	-	-	-	-	8,41	0,14
DTU089	0,30±0,16	0,43±0,21	0,31±0,18	0,32±0,20	0,40±0,18	0,26±0,13	1,89	0,86
Faecalibacterium	9,82±4,42	7,95±5,35	6,70±5,72	9,26±4,75	4,92±3,55	6,75±2,76	2,89	0,72
Fournierella	0,22±0,28	0,06±0,10	0,19±0,07	0,05±0,05	-	-	9,07	0,11
Intestinimonas	-	-	0,17±0,29	-	-	-	5,00	0,42
Negativibacillus	0,30±0,11	0,67±0,30	0,22±0,09	0,27±0,08	0,37±0,45	0,18±0,06	6,66	0,25
Oscillibacter	-	0,04±0,07	0,09±0,08	0,08±0,08	0,14±0,13	-	6,53	0,26
Ruminiclostridium 5	0,93±0,31	1,10±0,21	1,17±0,75	0,94±0,10	1,20±0,12	0,76±0,05	6,17	0,29
Ruminococcaceae NK4A214 group	0,53±0,36	0,35±0,18	1,52±1,33	0,46±0,41	0,43±0,51	0,34±0,36	1,56	0,91
Ruminococcaceae UCG-004	0,27±0,04	0,28±0,08	0,27±0,12	0,23±0,08	0,41±0,19	0,27±0,14	2,38	0,79

Ruminococcaceae UCG-005	0,19±0,17	0,48±0,16	0,60±0,75	0,35±0,11	0,28±0,40	0,15±0,10	5,10	0,40
Ruminococcaceae UCG-009	0,01±0,02	0,01±0,02	0,02±0,03	0,01±0,02	0,11±0,03	0,03±0,04	8,70	0,12
Ruminococcaceae UCG-010	0,05±0,09	0,07±0,06	0,08±0,08	0,16±0,14	0,01±0,01	0,03±0,03	2,95	0,71
Ruminococcaceae UCG-013	1,42±1,05	1,54±0,61	0,91±0,16	1,09±1,21	1,19±0,47	0,97±0,77	1,33	0,93
Ruminococcaceae UCG-014	14,82±5,81	8,02±0,84	11,23±8,34	12,73±6,43	8,05±3,37	12,45±1,21	6,05	0,30
Ruminococcus 1	0,01±0,02	0,04±0,04	0,04±0,06	0,06±0,10	0,03±0,05	0,02±0,04	0,63	0,99
Ruminococcus 2	0,08±0,14	0,02±0,03	-	-	-	-	4,25	0,51
Subdoligranulum	6,32±0,52	4,96±0,97	5,63±2,86	25,47±19,39	15,69±10,19	14,11±5,09	12,70	0,03
Ruminococcaceae_uncultured	0,19±0,15	0,05±0,09	0,20±0,08	0,03±0,04	0,07±0,12	-	9,71	0,08
Erysipelatoclostridium	3,43±1,13	1,70±0,38	2,70±0,21	2,37±1,76	1,36±0,78	1,78±0,21	9,16	0,10
Merdibacter	0,07±0,01	0,19±0,06	0,16±0,09	0,16±0,13	0,20±0,18	0,19±0,22	1,98	0,85
Turcibacter	0,53±0,50	0,14±0,16	0,37±0,15	0,04±0,04	0,01±0,01	0,40±0,25	11,27	0,05
Phascolarctobacterium	0,07±0,06	0,15±0,04	0,06±0,03	0,03±0,05	0,06±0,06	0,07±0,04	8,19	0,15
Azospirillum sp. 47_25	0,06±0,10	-	-	-	-	-	5,00	0,42
Bilophila	-	-	-	-	0,04±0,04	0,02±0,04	7,86	0,16
Parasutterella	-	0,04±0,07	-	0,01±0,02	0,08±0,09	-	6,43	0,27
Escherichia-Shigella	0,13±0,03	0,67±0,20	0,21±0,16	0,61±0,86	0,34±0,20	0,54±0,10	8,35	0,14
Acinetobacter	0,06±0,08	0,07±0,08	0,02±0,03	0,03±0,03	0,04±0,04	-	3,92	0,56
Pseudomonas	0,03±0,04	0,04±0,05	0,01±0,02	-	0,01±0,01	0,05±0,08	3,14	0,68
uncultured bacterium	0,64±0,55	0,38±0,31	0,38±0,47	0,24±0,38	0,02±0,03	0,25±0,35	3,51	0,62
Akkermansia	0,10±0,13	1,41±2,37	0,10±0,16	0,01±0,01	0,07±0,10	0,10±0,17	2,75	0,74
Unknown	26,99±3,38	33,14±5,69	30,37±5,69	21,70±1,01	43,00±3,26	30,30±1,47	13,35	0,02

Relative abundance data are expressed as mean ± standard deviation of 3 replicates and a pool of 8 birds/replicate.
p values and chi-squared by non-parametric Kruskal-walis test.

5 ARTIGO 2 – Artigo formatado de acordo com as normas da revista Plos One

Efeitos da suplementação alimentar com uma mistura de óleos funcionais ou probiótico no desempenho e no perfil da microbiota de leitões recém-desmamados

Alexandre Maciel Vieira ¹, Amanda Pires Sessin ¹, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto ², Kátia Maria Cardinal³, Glauber Wagner ², Lucélia Hauptli ¹, André Luis Ferreira Lima ¹, Fabiano Dahlke ¹, Diego Peres Netto ¹, Priscila de Oliveira Moraes ¹

1 Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

2 Laboratório de Bioinformática, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

3 Departamento de Zootecnia, Laboratório de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Autor correspondente:

E-mail: p.agronomia@gmail.com (POM)

Os autores contribuíram igualmente para este trabalho.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar uma mistura comercial de óleos funcionais à base de líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona como promotor de crescimento em leitões recém-desmamados. Foram avaliados 225 leitões, machos castrados e fêmeas com $8,54 \pm 1,22$ kg de peso vivo, com 28 dias de idade, distribuídos aleatoriamente em baias com 15 animais formando três tratamentos e cinco repetições (baias). Todos os tratamentos receberam a mesma dieta diferindo-se apenas pela presença dos aditivos: Controle Negativo: sem inclusão de aditivos zootécnicos; 0,6% de probióticos; 0,35% de óleos funcionais. Foram avaliados o ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA) e ocorrência de diarreia. Aos 50 dias de idade foi coletado um pool de fezes frescas de 3 animais por repetição para realizar o sequenciamento de 16S rRNA nas regiões V3 e V4 usando a plataforma Illumina MiSeq e para o isolamento de *Escherichia coli*; e o sangue para realização de hemograma.. A suplementação com óleos funcionais melhorou o GPD e a CA ($P < 0,05$) dos leitões nas primeiras semanas do experimento, o que culminou em maior peso vivo final ($P < 0,05$) na fase em comparação ao tratamento controle negativo. Os animais que receberam probióticos apresentaram desempenho intermediário. Os parâmetros sanguíneos, leucócitos e hemácias, variaram dentro do intervalo de referência para a espécie. Ambos aditivos foram eficazes em modular grupos centrais à saúde intestinal, como Ruminococcaceae e Lachnospiraceae. A mistura foi mais efetiva em reduzir bactérias patogênicas, como *Campylobacter* e *Escherichia coli*. Em conclusão, a utilização da mistura de óleos funcionais otimizou o desempenho e modulou eficazmente a microbiota de leitões recém desmamados.

INTRODUÇÃO

Durante o desmame de leitões ocorrem diversos fatores estressores, tais como separação da mãe e dos irmãos de leitegada, estresse no transporte e no manuseio, reformulação da hierarquia social devido ao alojamento na creche misturando animais de diferentes leitegadas, estresse oxidativo, inflamação, disbiose e, em consequência, pode levar a diarreia, queda no crescimento e aumento da taxa de mortalidade destes jovens animais (1). A diarreia é um importante fator de impacto econômico negativo no período de creche, e tem como principal agente patogênico a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) K88 (3).

Durante muitas décadas a utilização de antibióticos em pequenas concentrações foi a principal ferramenta para minimizar o impacto negativo do desmame, agindo como um promotor de crescimento (4). Contudo, recentemente, o uso indiscriminado desses antimicrobianos frente aos riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente, devido a presença de bactérias resistente a antibióticos, tem chamado atenção de autoridades competentes, e levado muitos países à remoção dos antibióticos como promotores de crescimento de seus sistemas de criação (5).

Todavia, a restrição dos antibióticos como promotores de crescimento em diversos países aliado a falta de compostos com potencialidade semelhante tem levado a reduções no desempenho e alta mortalidade de suínos, principalmente na fase de creche (6)). Neste contexto, as pesquisas têm se voltado à descoberta de compostos para alimentação animal capazes de substituírem os antibióticos como promotores de crescimento em leitões desmamados.

Os probióticos são microrganismos vivos que agem modulando a microbiota intestinal do hospedeiro (7, 9); seus efeitos benéficos advêm da adesão ao epitélio, inibição do crescimento e, conseqüentemente, da produção de toxinas, por bactérias patogênicas (10)). Por exemplo, a suplementação com *Lactobacillus spp* demonstrou reduzir as contagens fecais

de *Salmonella* sorovar *Typhimurium* KCTC 2515 e *Escherichia coli* KCTC 2571 em leitões desmamados, aumentando o ganho médio diário e o consumo diário médio de ração (11).

Óleos funcionais são definidos como aqueles óleos que possuem uma ação além do valor nutricional (12), e tem sido difundidos na suinocultura, principalmente, com ação antimicrobiana e, também, moduladores da microbiota intestinal (2, 13). O ácido anacárdico, principal componente do líquido da casca de castanha de caju (14), atua inibindo o crescimento de bactérias patogênicas por indução à apoptose celular (15). Enquanto o ácido ricinoleico, principal componente do óleo de mamona, atua desnaturando e coagulando as proteínas da parede celular bacteriana (16).

A mistura comercial contendo óleos funcionais de líquido de casca de castanha de caju e óleo de mamona já demonstrou efeitos positivos no desempenho, na modulação da microbiota intestinal e sistema imune de frangos de corte desafiados por coccidiose (12, 17, 18). Porém, inexistem estudos publicados analisado os efeitos deste produto no desempenho e microbiota de suínos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com probiótico ou uma mistura comercial de óleos funcionais à base de líquido da casca de castanha de caju e óleo de mamona no desempenho, parâmetros sanguíneos e composição microbiana intestinal de leitões recém-desmamados.

Material e métodos

O trabalho aqui descrito foi realizado de acordo com o protocolo nº 3665110718 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina. Este experimento foi realizado em ninhada para terminação de granja de suínos, no município de Jaguaruna - Santa Catarina / Brasil.

Animais, instalações e dietas

Ao total 225 leitões descendentes de linhagens comerciais de fêmeas F1 (Landrace x Large White) com machos Tricross (Hampshire x Duroc x Pietran), desmamados aos 28 dias de idade, machos castrados e fêmeas, com aproximadamente $8,54 \pm 0,622$ kg foram distribuídos aleatoriamente em 15 baias, com uma densidade de 0,3 leitões/m³ com piso vasado de madeira e equipadas com comedouro e bebedouro.

Os animais tiveram acesso livre a ração e a água durante todo o período experimental. O estudo foi dividido nas seguintes fases: fase I - de 28 a 43 dias; fase II - de 43 a 57 dias; e fase III - de 57 a 66 dias, de acordo com as dietas formuladas para atender as exigências nutricionais dos leitões para a fase em estudo (19). As dietas diferiram-se apenas pelo aditivo utilizado, conforme apresentado na Tabela Suplementar 1. Os tratamentos foram: grupo controle: sem inclusão de aditivos zootécnicos; grupo probióticos: inclusão de 0,6% (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidiphilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccaromyces cerevisiae*); grupo mistura de óleos funcionais com a inclusão de 0,35% (0,2% de Essential® em 0,2% + 0,15% de Integrity ®). Ambos os aditivos para rações, mistura (Oligo Basics Agroind. Ltda, Cascavel, PR, Brazil) e probiotico (Elanco Animal Health, Greenfield, IN, USA), foram incluídos pela substituição do inerte (caulim) na dieta basal em todas as fases.

Procedimentos experimentais e coleções

A ração fornecida e os animais foram pesados no início e no final de cada fase para determinar o ganho de peso médio diário (GPMD), o consumo médio de ração diária (CRMD), e calcular a conversão alimentar (CRMD:GPMD). A ração desperdiçada pelos leitões foi coletada no chão próximo aos comedouros, diariamente, pesados e descontada da quantidade fornecida aos animais.

Durante os primeiros 14 dias de experimento a ocorrência de diarreia foi monitorada diariamente por observação visual, sempre pelo mesmo observador. A consistência das fezes foi avaliada de acordo com os seguintes escores: 1 - fezes normais; 2 - fezes pastosas; e 3 - fezes diarreicas. As fezes atribuídas com os escores 1 e 2 foram consideradas normais e as fezes com escore 3 foram consideradas fezes diarreicas. A frequência de diarreia foi calculada com base no número de dias de observação. A frequência de escores de fezes 1, 2 e 3 foi a porcentagem de dias em que os leitões apresentaram escores de fezes 1 ou 2 ou 3 em cada baia, calculada da seguinte forma: Frequência de escores de fezes 1 ou 2 ou 3 (%) = $\{[(P1 \times D) + (P2 \times D) + (Pn \times D)] / n / TD\} \times 100$, onde P (1, 2... n) = representa cada leitão dentro da baia (n); D = é o número de dias que cada leitão mostrou pontuações de fezes 1, 2 ou 3 dentro de uma baia; TD = é o número total de dias em que os escores de diarreia foram monitorados (20).

Aos 50 dias de idade dos leitões foram coletados 2 mL de sangue da veia jugular de um leitão por repetição, com peso na média do grupo de cada baia, para a realização de um hemograma. Um contador automático de células (Vet Scan HM 5; Abaxis) foi usado para avaliar hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e leucócitos, calculou-se a razão entre neutrófilos para linfócitos.

Aos 50 dias de idade, para o isolamento de *Escherichia coli* foi realizado swab de um pool de fezes frescas de 3 animais por repetição. Estes swabs foram estriados em Placas de Petri contendo ágar MacConkey (Merck®), incubado a 37° C por 24h para a contagem das unidades formadoras de colônias.

Deste mesmo pool, foi retirado 2g de fezes para o sequenciamento da microbiota por Illumina MiSeq. Estas amostras foram identificadas e congeladas a -20°C para posterior análise.

Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

Essas amostras foram colocadas em um tubo estéril de 1,5 mL e enviadas à Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis-SC, Brasil). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a metodologia previamente descrita (21). A preparação e o sequenciamento da amostra foram realizados pela Neopropecta Microbiome Technologies. Para extração total de DNA, o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Consistia nas regiões V3 / V4 do gene 16S rRNA, que foram amplificadas usando iniciadores 341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), com adaptadores Illumina, necessários para sequenciamento. A amplificação foi realizada em 35 ciclos a 50 ° C da temperatura de anelamento, que foi triplicada para cada amostra. O sequenciamento foi realizado pelo Illumina MiSeq usando kits V2, com execuções de 300 nucleotídeos de extremidade única.

Análise de sequência

A qualidade da leitura foi avaliada por meio do software FastQC (versão 0.11.5). Leituras de baixa qualidade foram removidas e adaptadores utilizando o programa Trimmomatic. As leituras foram submetidas a uma abordagem de Denoising para remoção de sequência de baixa qualidade, correção de erro de sequenciamento, remoção de quimera e identificação das variações de amplificação de sequência (ASVs) usando o método DADA2. A taxonomia foi atribuída às ASVs utilizando o banco de dados SILVA versão 132, com 97% de correspondência, utilizando o software Qiime 2 versão 2019.1 (22).

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (sem aditivos, probióticos ou blend de óleos funcionais), cinco repetições por tratamento (bacias) e 15 animais por repetição. As variáveis de desempenho, frequência de diarreia, sangue e quantificação de *E.coli* foram submetidas à análise de variância com nível de 5% de significância, e o teste de médias pelo Tukey, pelo programa estatístico SAS.

Os índices de abundância relativa, rarefação alfa, alfa (Chao-1, Shannon e Simpson) e diversidade beta foram realizados usando o programa R, versão 3.6 (<https://www.R-project.org/>) e o `plyr` (v 1.8.4) (23), `remodelagem 2` (v. 1.4.3) (24) e pacotes `phyloseq` (v. 1.14.0) (25). A diversidade beta foi estimada após a normalização do número de sequências, escolhendo aleatoriamente sequências nas amostras para que cada amostra obtivesse o mesmo número de sequências. Após a normalização, uma análise de coordenadas principais (PCoA) e um mapa de calor foram realizados usando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis com os pacotes `vegan` (v. 2.4.1) (26) e `mapas de calor` (v. 1.8.0) (27). O diagrama de Venn e o `UpsetR` foram gerados usando os pacotes `venn` (v. 1.7) (28) e `UpSetR` (v. 1.4.0) (29) pacotes R. A abundância relativa e a diversidade alfa foram testadas pelo teste de Kruskal - Wallis. Os testes de análise de similaridade (ANOSIM) foram realizados com base na diversidade beta.

RESULTADOS

Desempenho e frequência de diarreia

Os efeitos dos aditivos no desempenho e na frequência de diarreia são apresentados na Tabela 1. O GPMD nas fases 1, 2 e na média geral foi maior estatisticamente para o grupo que recebeu a mistura de óleos funcionais na dieta quando comparado com o grupo controle, o grupo com probiótico apresentou um comportamento intermediário. O mesmo comportamento foi observado no peso vivo aos 57 e 66 dias de vida. Foi possível

observar que, na média, houve um menor CRMD para grupos de suínos que receberam a mistura de óleos funcionais ($p < 0,05$) quando comparados aos demais grupos, fato que refletiu em uma melhor média de CA.

Tabela 1 – Efeito da dieta com diferentes aditivos no desempenho de suínos desmamados na fase 1 (28-43 dias de idade), fase 2 (43-57 dias de idade), fase 3 (57-66 dias de idade), media (28-66 dias de idade).

Item	Aditivos			SEM ⁵	p-value
	Controle ¹	Óleos ²	Probiotico ³		
Taxa de mortalidade (%)	10	2,65	4,85	2,28	0,0504
Peso corporal, kg					
Dia 28	8,66	8,77	8,83	0,326	0,6897
Dia 43	11,25	12,21	11,5	0,437	0,2936
Dia 57	17,90 ^b	19,84 ^a	18,68 ^{ab}	0,620	0,0427
Dia 66	21,55 ^b	24,34 ^a	23,66 ^{ab}	0,804	0,0498
Ganho médio diário, g					
Fase 1	0,182 ^b	0,228 ^a	0,211 ^{ab}	0,170	0,0147
Fase 2	0,622 ^b	0,762 ^a	0,687 ^{ab}	0,018	0,0031
Fase 3	0,947	1,051	1,022	0,056	0,2985
Geral	0,313 ^b	0,342 ^a	0,335 ^{ab}	0,015	0,0240
Consumo médio de ração diário, g					
Fase 1	0,325	0,328	0,320	0,310	0,2026
Fase 2	1,085	1,140	1,110	0,032	0,1226
Fase 3	2,050	2,030	2,050	0,032	0,4649
Geral	0,705 ^a	0,688 ^b	0,7089 ^a	0,021	0,0350
Taxa de conversão alimentar					
Fase 1	1,771 ^a	1,482 ^b	1,538 ^{ab}	0,292	0,0371
Fase 2	1,738 ^a	1,504 ^b	1,628 ^{ab}	0,054	0,0409
Fase 3	2,174	1,932	2,050	0,377	0,1689

Geral	2,175 ^a	2,028 ^b	2,126 ^a	0,090	0,0490
-------	--------------------	--------------------	--------------------	-------	--------

Mínimos quadrados significativos com base em observações de 5 baias por dieta.

¹Controle: sem inclusão de aditivos zootécnicos; ²Probióticos: inclusão de 0,2% de probiótico e 0,4% de *Bacillus subtilis*. Composição do probiótico: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae*; ³ óleos funcionais com a inclusão de 0,2% de Essential® em 0,2% + 0,15% de Integrity® ,

^{ab} As médias dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem ($P < 0.05$).

O percentual de fezes diarreicas foi menor para os animais que receberam a mistura ($p < 0,05$) (Fig. S1).

Microbiota intestinal e leucograma

Um total de 974.413 sequências aparadas de qualidade foi produzido com um número médio de sequências por amostra de $64.960,87 \pm 18.783,45$ (Tab.S2). Uma amostra (181113520761-1-1-1) do tratamento mistura foi desconsiderada devido ao baixo número de sequências em comparação com as outras amostras. As leituras foram processadas e classificadas em 1.348 variações na amplificação de sequência (ASVs).

As curvas de rarefação geradas a partir de ASVs (Fig S2) mostraram alta cobertura de sequenciamento em todas as amostras. As curvas de rarefação tenderam a atingir o platô de saturação, mostrando que a microbiota das 14 amostras foi profunda o suficiente para estimar a riqueza fenotípica e a diversidade da comunidade microbiana.

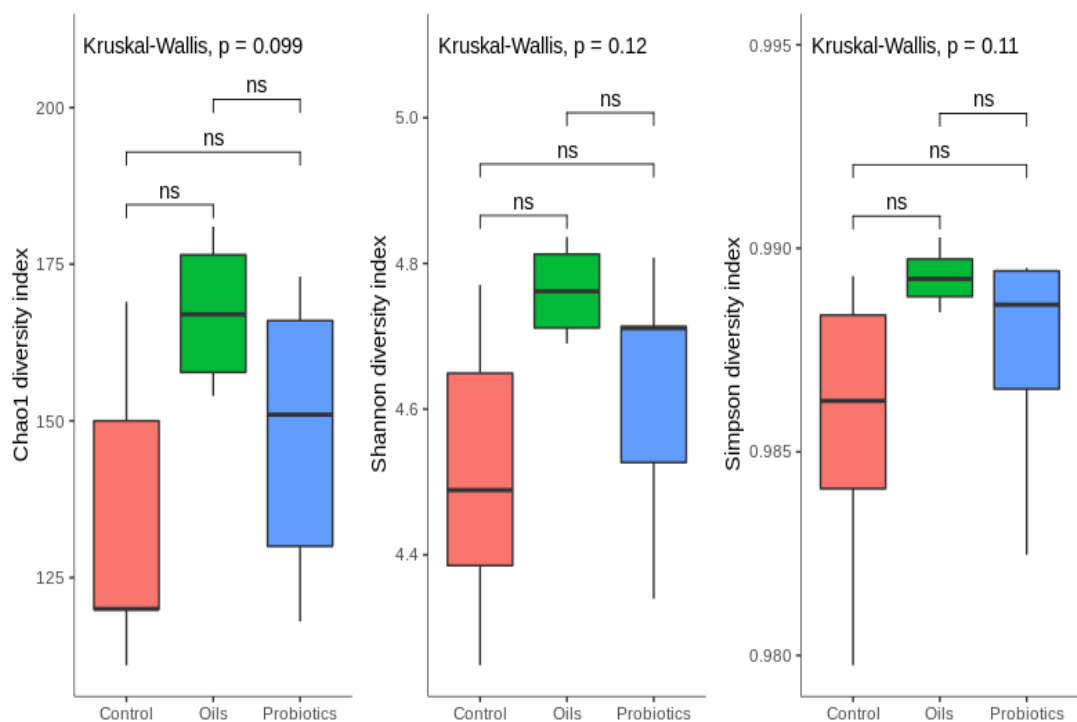
Variação na diversidade alfa e beta da microbiota.

Alfa diversidade

O índice Chao 1 (número mínimo de ASVs presentes em uma amostra) foi baseado na riqueza de famílias presentes na amostra. O índice de Shannon considerou uniformidade na abundância familiar, e o índice de Simpson foi baseado na dominância da

abundância (Fig. 1). Os índices Chao, Shannon e Simpson não apresentaram diferença significativa entre os três tratamentos ($p > 0,05$). Apesar de não ser estatisticamente distinta entre os grupos, foi possível observar uma tendência de maior riqueza e uniformidade para os grupos que receberam a mistura ou probiótico quando comparado ao controle.

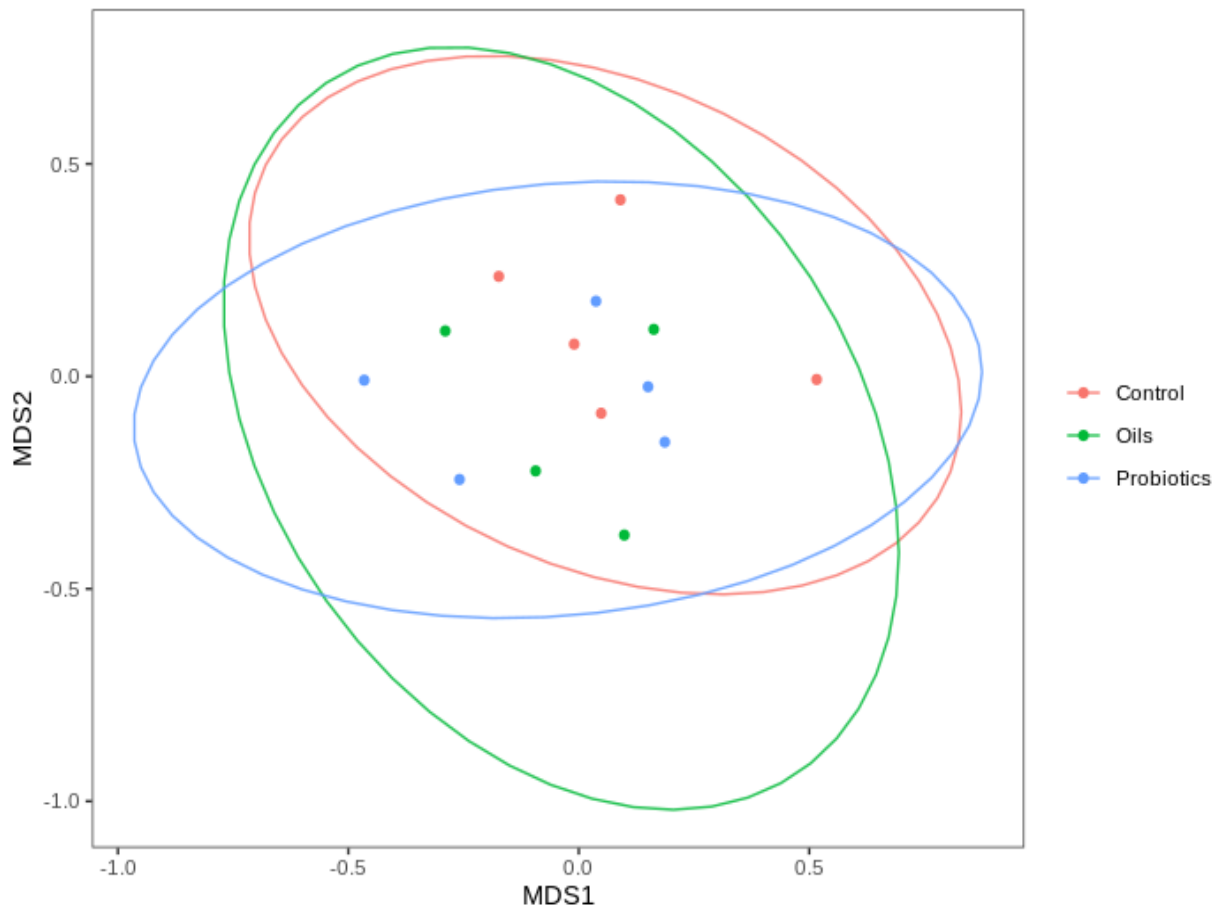
Figura 1. Diversidade alfa em nível de família de acordo com os tratamentos sem aditivos (control), Óleos Funcionais (Oils) ou Probióticos.



Beta diversidade

Para analisar as diferenças interindividuais, foi utilizado o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (BC) que mostrou que os tratamentos tinham uma composição microbiana semelhante. Com base no gráfico PCoA (Figura. 2) baseado na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis foi possível observar que as populações microbianas dos animais de todos os três tratamentos apresentaram dispersão homogênea.

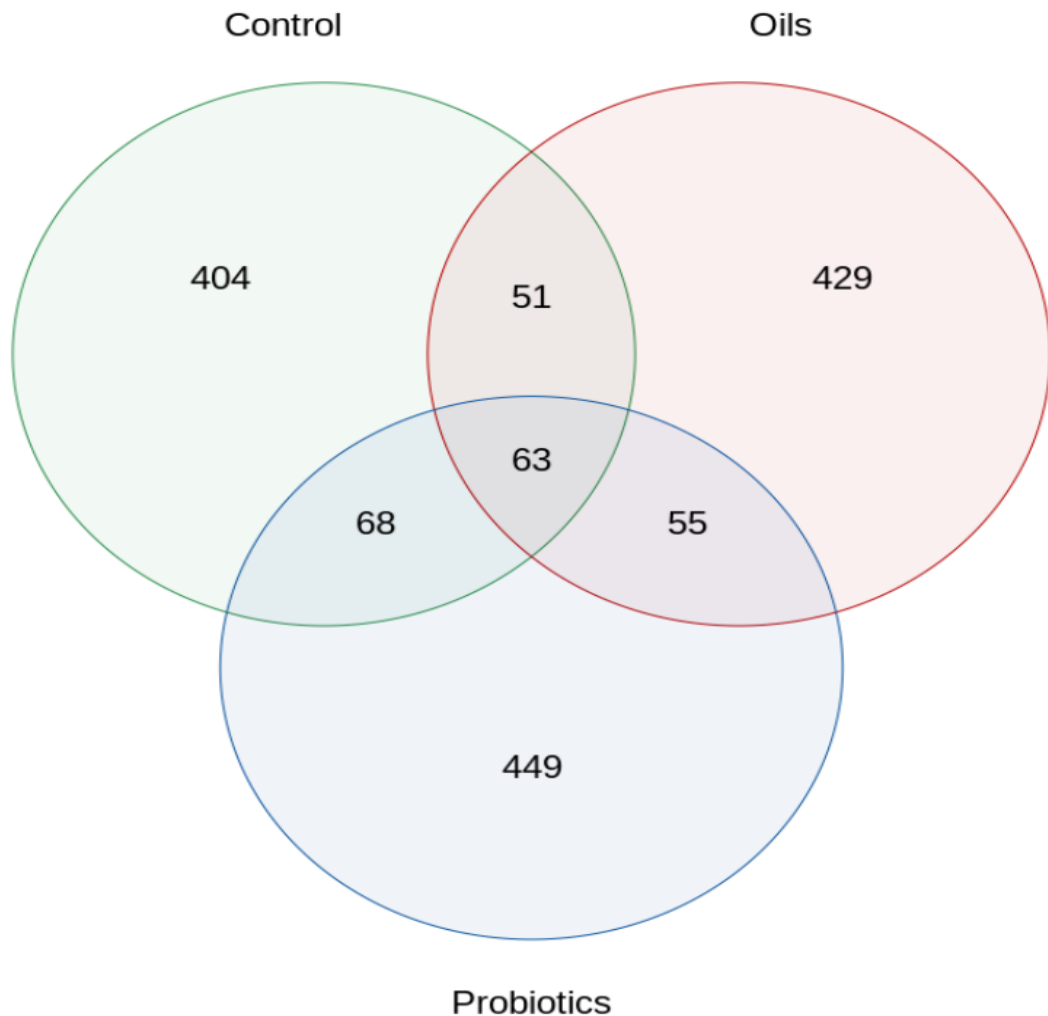
Figura 2. Análise das coordenadas principais (PCoA) da diversidade beta com base na dissimilaridade de Bray-Curtis de acordo com os tratamentos, sem aditivos (Control), Óleos funcionais (Oils) ou Probióticos. Comparação entre os tratamentos mistura, probióticos e controle (Adonis com 999 permutações, $p = 0,297$).



Populações microbianas comuns e únicas.

Uma comparação emparelhada da similaridade microbiana entre os tratamentos, bem como uma análise de ASVs comuns, mostrada no diagrama de Venn (Figura 3), foi realizada para investigar a comunidade microbiana. Um total de 63 ASVs foi comum a todos os grupos, o número de ASVs presentes em apenas um grupo variou de 404 para o controle a 449 para o grupo probiótico. O probiótico aumentou o número de ASVs presentes em apenas um grupo.

Figura 3. ASVs compartilhados ou não compartilhados pelos três tratamentos compostos por uma dieta sem aditivo (control), com Óleos funcionais (oils) ou Probióticos.



O diagrama de Venn mostra o número de ASVs compartilhados ou não compartilhados pelos três tratamentos, dependendo das sobreposições.

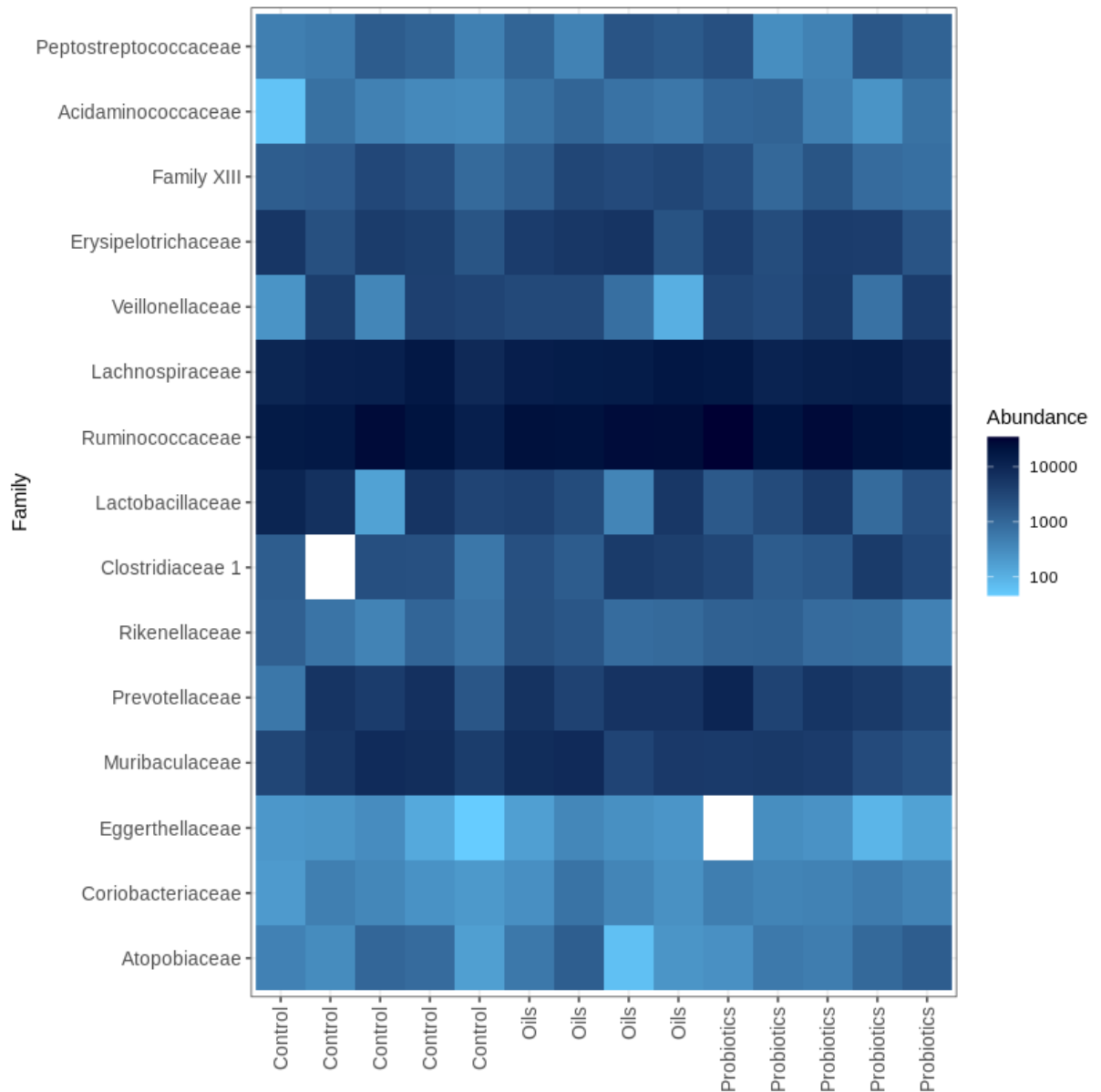
Todas as sequências foram classificadas em onze filos, embora quatro filos foram mais comuns (> 1%): Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéria e Tenericutes. Firmicutes foi o filo mais abundante em todos os tratamentos (> 80%). Entre todos os tratamentos não houve diferença neste filo (~80%). Bacteroidetes diminuiu para ambos os tratamentos, mistura e

probióticos, porém com menor redução no segundo. Actinobactéria foi reduzido no grupo que recebeu suplementação com a mistura e aumentado no grupo suplementado com probióticos quando comparado ao grupo controle. Comportamento inverso foi observado para Tenericutes.

No nível de classe, Clostridia foi a classe mais abundante > 58% das sequências das 14 amostras (Fig S3. Em relação ao controle, houve aumento desta classe para ambos os tratamentos com aditivos. Ao contrário das classes Erysipelotriquia e Bacilli que reduziram a presença nos grupos que receberam os aditivos quando comparado com o controle. A classe Bacteroidia aumentou no grupo mistura (~18%) e diminuiu no grupo probióticos (~15%) em relação ao grupo controle. A classe Negativicutes reduziu no grupo que recebeu a mistura e aumentou para o grupo com probióticos (~3% vs. ~5%).

Foram identificadas quarenta e três famílias (43), das quais catorze (14) apresentaram abundância relativa > 1% (Figura 4). Uma lista completa das sequências identificadas (abundância relativa) por tratamento é fornecida na Tabela 3 (SUPLEMNTAR).

Figura 4. Distribuição microbiana das catorze amostras.

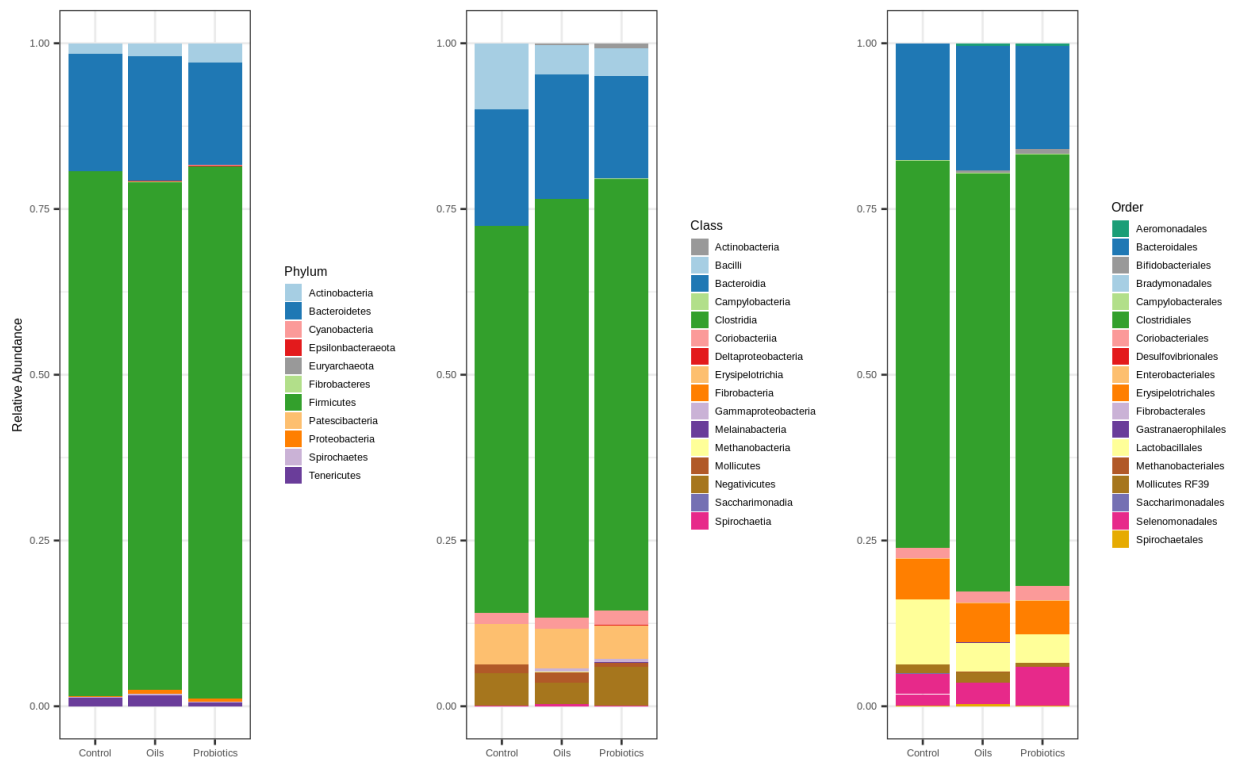


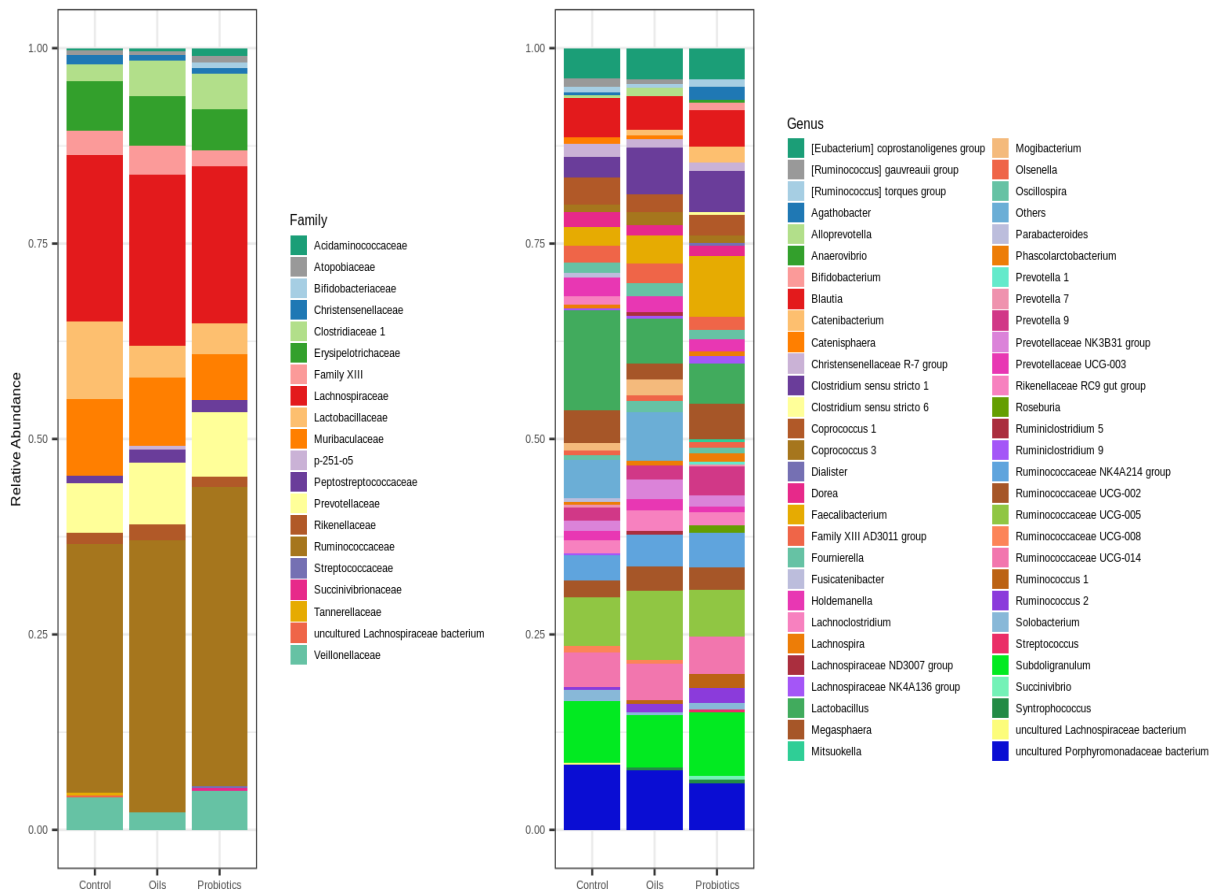
Mapa de calor baseado na solução de agrupamento hierárquico (métrica de distância Bray – Curtis e método de agrupamento completo) das catorze amostras. As linhas representam as 15 famílias bacterianas predominantes. As colunas representam as catorze amostras, e os valores no mapa de calor representam a abundância transformada em \log_{10} de cada família bacteriana, indicada no lado direito da figura.

A família Ruminococcaceae foi predominante em todos os grupos ($> 30\%$), principalmente em animais suplementados com probióticos ($> 36\%$), figura 5. A família Lachnospiraceae foi a segunda mais abundante ($> 19\%$). Quando comparamos ao controle

Lactobacillaceae diminuiu para ambos aditivos (~ 9% vs. ~3%). Comportamento semelhante foi observado para Muribaculaceae, porém com menor diminuição percentual para os animais que receberam a mistura. Clostridiaceae 1 foi aumentada para ambos os aditivos.

Figura 5. Abundância relativa da microbiota intestinal de leitões desmamados tratada com dois aditivos alimentares, dieta basal (Controle), Óleos funcionais (Blend) ou Probióticos.





A concentração de *E. coli* nas fezes diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) na qual as fezes dos leitões submetidos ao tratamento controle apresentaram maior concentração de *E. coli* quando comparado com o tratamento com a mistura de óleos funcionais, o tratamento com probiótico foi considerado intermediário (Fig S4).

O leucograma (Tab. S4) mostrou um aumento na concentração de linfócitos nos grupos controle e probióticos quando comparado ao tratamento com a mistura ($p < 0,05$). Os demais parâmetros, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Houve uma tendência na redução da taxa de mortalidade para os grupos de animais que receberam aditivos.

Discussão

Desempenho e frequência de diarreia

Ao longo do experimento foi possível observar que a utilização dos óleos funcionais foram essenciais para a fase crítica do desmame que corresponde à primeira semana, quando a mudança de uma dieta altamente digestível (leite materno) para um alimento sólido de digestibilidade mais complexa afeta diretamente a fisiologia, ainda não totalmente adaptada, do trato gastrointestinal dos leitões (30), causando disfunção intestinal e do sistema imunológico que resultam em menor saúde, crescimento e ingestão de alimentos (1).

A utilização dos óleos funcionais refletiu em maior ganho de peso médio diário (GPMD) e conversão alimentar (CA) dos leitões submetidos a este tratamento no primeiro e segundo período, e ainda, no efeito acumulativo no peso vivo dos animais no peso vivo final para este mesmo grupo.

Embora não esteja claro exatamente como a suplementação de óleos funcionais melhora o crescimento de suínos, vários mecanismos foram propostos, incluindo atividade antimicrobiana (por exemplo, redução do estresse patogênico ou aumento da abundância de microrganismos benéficos no intestino, como *Lactobacillus spp* (2, 31); protegendo as vilosidades intestinais e regulando a atividade enzimática (32, 33); ainda, modulando a microbiota intestinal e aumentando a absorção de nutrientes (13, 34).

Estudos anteriores demonstraram que a suplementação de uma mistura de óleos funcionais (cinamaldeído e timol) na dieta de leitões desmamados inferiu positivamente em características de interesse zootécnico, como maior GPMD e menor CA ($P < 0,05$) (35)(36), semelhantemente aos resultados do presente trabalho. Por sua vez, avaliando a suplementação de *L. acidophilus* em leitões desmamados Lan, Koo (37) também observaram melhoria no GPMD e CA ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle, assim como observado no grupo probiótico no presente estudo.

Microbiota intestinal e leucograma

Os probióticos atuam modulando a microbiota, principalmente, por adesão e exclusão competitiva de patógenos em sítios de ligação no epitélio intestinal (38). Enquanto que o a mistura de óleos funcionais utilizados neste estudo atua modulando o sistema imunológico e a microbiota intestinal com ação antimicrobiana, principalmente, contra bactérias gram-positivas, como demonstrado por (18, 39). Por mecanismos de ação diferentes, ambos os aditivos proporcionaram melhor desempenho e modulação da microbiota frente ao desafio do desmame.

Neste estudo não houve diferença na diversidade microbiana entre os aditivos, estimada pelos índices Chao, Shannon e Simpson. Resultados semelhantes foram encontrados por Li, Fu (40) e Luise, Bertocchi (41) que avaliaram a suplementação de óleos essenciais e probióticos em leitões desmamados, respectivamente. Embora sem diferença estatística, houve tendência de aumento da diversidade para o grupo suplementado com a mistura. O aumento da riqueza e diversidade microbiana pode ser visto como preditor à estabilidade do ecossistema microbiano (42).

Os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria, em ordem decrescente em abundância relativa, são predominantes no trato gastrointestinal de suínos (8, 43, 44), o que está de acordo com nossos dados. Neste estudo, a abundância relativa de Firmicutes aumentou e a de Bacteroidetes diminuiu após a suplementação com ambos aditivos. Foi demonstrado que suínos mais pesados tendem a ter uma razão Firmicutes:Bacteroidetes mais alta do que a animais mais leves (45), semelhante ao observado neste estudo.

Estudos *in vivo* já demonstraram que os óleos funcionais modificam a composição da microbiota intestinal, aumentando a abundância relativa de Firmicutes no intestino de frangos de corte por Salaheen, Kim (46) e de suínos por Li, Fu (40). Vale

salientar que o aumento da razão Firmicutes:Bacteroidetes é uma tendência natural encontrada com o amadurecimento de uma microbiota intestinal saudável em leitões (47). Mas que em situações de disbiose, como as causadas pelo desmame, pode acarretar na diminuição de Firmicutes e elevação de Bacteroidetes, proporcionando ambiente favorável à proliferação de alguns gêneros patogênicos deste segundo filo e, conseqüentemente, redução da eficiência alimentar dos animais (48).

Por outro lado, a redução demasiada de Bacteroidetes pode acarretar, também, em prejuízos ao hospedeiro. Isso porque Bacteroidetes, apesar de englobar algumas espécies patogênicas, é conhecido por possuir um grande número de genes que codificam enzimas ativas de carboidratos podendo alternar prontamente entre diferentes fontes de energia, além de ser uma importante fonte de propionato (49, 50). Enquanto Firmicutes tem membros mais nutricionalmente especializados na degradação de substratos complexos, como paredes celulares de plantas, partículas de amido e mucina (51, 52). Logo, uma relação estável entre Firmicutes e Bacteroidetes pode resultar em melhor utilização da dieta pelos animais.

No presente estudo, ambos aditivos foram eficazes em manter a razão Firmicutes:Bacteroidetes, fato que pode ter contribuído para melhor performance dos animais de ambos os grupos suplementados.

Tenericutes também parece estar envolvida no melhor aproveitamento de ingredientes pelo hospedeiro. Em um estudo com leitões Niu, Li (53) encontram correlação positiva deste filo com uma melhor digestibilidade aparente de fibra bruta. No entanto, dados sobre este filo e sua relação com o desempenho animal ainda são escassos. Proteobactéria é mais conhecido por comportar inúmeros patógenos oportunistas aos animais e aos humanos, incluindo *Escherichia coli*, *Escherichia Shigella*, *Salmonella*, *Brucella*, *Rickettsias* spp., entre outros, estando, assim, associado a diversos distúrbios intestinais e doenças infecciosas

(54, 55). Neste estudo, a utilização de óleos funcionais incrementou Tenericutes e inibiu Proteobacteria.

Ao nível de família, a suplementação com ambos aditivos manteve a abundância relativa de Lachnospiraceae estável, aumentou a abundância de Ruminococcaceae e Prevotellaceae, e reduziu Lactobacillaceae. Essas quatro famílias são conhecidas por fazerem parte de um grupo fundamental à atividade microbiana no intestino dos leitões (56).

Ruminococcaceae, por exemplo, estão associadas a degradação de fibra e maiores concentrações de butirato em leitões (57, 59). O butirato contribui para uma melhor absorção de nutrientes (60), estimulando o crescimento das células da mucosa intestinal, melhorando a retenção de cálcio e fósforo na dieta (61), mitigando o desafio do desmame (62) e induzindo a secreção de mucina, uma glicoproteína, que forma uma camada protetora nos enterócitos (63).

O gênero *Faecalibacterium*, das Ruminococcaceae, tem sido associado negativamente a eficiência alimentar em suínos (64). No presente estudo, este gênero esteve presente em maior porcentagem no grupo probióticos em relação ao grupo mistura e controle.

Prevotella e Lachnospiraceae estão positivamente correlacionados com funções gênicas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, energia, cofatores e vitaminas, indispensáveis ao hospedeiro (65). *Prevotella* também tem sido associada positivamente com maiores concentrações luminiais de IgA e peso corporal em leitões desmamados, evidenciando sua importância à saúde destes animais (66).

Por sua vez, *Lactobacillus* predomina na microbiota fecal de leitões no começo da vida (67) e tende a diminuir durante a transição do desmame (68). Diversas espécies do gênero *Lactobacillus* estão associadas a propriedades benéficas para o hospedeiro. Foi demonstrado que a população microbiana de suínos difere entre animais mais eficientes e menos eficientes, animais mais eficientes tendem a ter mais *Lactobacillus spp* do que animais menos eficientes (69).

Curiosamente, comportamento inverso foi observado no presente estudo, onde os grupos mistura e probióticos apresentaram menor abundância relativa deste gênero (~ 3%), porém melhor desempenho, enquanto grupo controle, maior abundância relativa (~ 9%) e menor desempenho zootécnico. Acreditamos que este comportamento pode estar associado à algumas correlações (positiva e negativa) entre gêneros.

Por exemplo, um estudo que rastreou a microbiota de leitões em cinco diferentes estágios de vida, revelou que no pós desmame (aos 63 dias de idade) *Lactobacillus* foi negativamente correlacionado com *Prevotella* (45), o que está de acordo com nossos resultados, onde observamos um incremento de *Prevotella* e redução de *Lactobacillus* para ambos os grupos suplementados em relação ao tratamento controle. Contudo, a diminuição de *Lactobacillus* no presente estudo não acarretou em prejuízos à performance dos animais.

Clostridiaceae é outra importante família do filo Firmicutes que passa, naturalmente, por incremento no trato gastrointestinal de leitões desmamados (67). Foi possível observar que os grupos suplementados pela mistura e probiótico apresentaram maior abundância relativa desta em relação ao controle. Sabe-se que dessa família existem diferentes espécies, incluindo *C. pectinovorum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*. *Clostridium butyricum*, por exemplo, que atuam na produção de ácidos graxos de cadeia curta e tem sido estudado como um probiótico em outras espécies animais, como frangos de corte, melhorando a função da barreira intestinal e inibindo patógenos (70).

Outro fato curioso, é que a suplementação com probióticos (contendo *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces cerevisiae*) não resultou em incremento desses gêneros na microbiota fecal dos leitões, à exceção de *Bifidobacterium*. Não está claro para nós o mecanismo envolvido por trás deste comportamento. No entanto, dois fatores podem explicar este fato. Primeiro, a tecnologia e condições envolvidas na preservação destes probióticos, que podem influenciar negativamente a viabilidade das cepas utilizadas até a

chegada no intestino delgado dos leitões. Em segundo, sabe-se que as diferentes espécies de bactérias estão sujeitas a condições adversas no trato gastrointestinal, e que, quando um microrganismo alimentado exogenamente como probiótico entra no trato gastrointestinal precisa competir com o ecossistema da microbiota existente (71), o que, em alguns casos, dadas as circunstâncias desfavoráveis, acaba dificultando a proliferação do microrganismo usado como probiótico (72).

A utilização de óleos funcionais também manteve a família Muribaculaceae, membro do filo Bacteroidetes, estável em relação aos demais tratamentos. Bactérias desse grupo foram relacionadas positivamente à regulação de genes para o metabolismo de carboidratos em camundongos (73). Acredita-se, ainda, que membros de Muribaculaceae estejam envolvidos na fermentação de amido para propionato, e que sua composição seja um importante preditor de maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) na microbiota intestinal saudável desses animais (74).

Por outro lado, o probiótico se saiu melhor em manter estável a abundância relativa de Veillonellaceae. Essa família está diretamente envolvida em funções metabólicas proteicas e enzimáticas essenciais ao hospedeiro (65).

Shigella spp. e *Escherichia coli* estão intimamente relacionadas e, embora com algumas diferenças, são considerados genomoespécies únicas. *Shigella* spp. estão entre os patógenos entéricos mais importantes que causam disenteria bacilar em todo o mundo, principalmente em humanos (75). Assim como observado em Enterobacteriaceae, ambos aditivos foram eficazes em inibir este gênero, com a mistura proporcionando uma abundância relativa levemente menor.

No mesmo sentido, pela técnica de cultura, *E. coli* reduziu significativamente ($P < 0,05$) nas fezes dos leitões tratados com a mistura, consistentemente com os resultados observados por Li, Ru (76) que mostraram que a adição de 100 ppm de óleos funcionais à

base de timol e cinamaldeído à dieta controle reduziu a contagem de *E. coli* nas fezes de leitões desmamados.

A razão dessa influência pode estar associada a atividade antimicrobiana dos óleos funcionais, já demonstrada *in vitro* por Yang, Zhang (77), onde estes autores avaliaram, também, uma mistura à base de timol e cinamaldeído e observaram a capacidade dessa em danificar a membrana celular e alterar a morfologia de células patogênicas de *E. coli* e *Staphylococcus aureus*; e *in vivo* por Gómez-García, Sol (78) que, avaliando a suplementação de seis óleos essenciais (entre eles timol, carvacol, e eugenol) em leitões desafiados por espécies enteropatogênicas (*E. coli*, *Salmonella* spp e *C. perfringens*) relataram atividade antimicrobiana destes óleos essenciais contra pelo menos uma dessas espécies. O comportamento intermediário do grupo Probiotico concorda com outros estudos (37, 72), que também relataram a capacidade da suplementação com Probiotico (*L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*) de reduzir *E. coli* fecal em leitões desmamados.

Ainda no grupo de bactérias patogênicas, foi possível observar a redução de *Campylobacter* pela suplementação da mistura de óleos funcionais. *Campylobacter* é o agente bacteriano predominante em leitões diarreicos, reduzindo a abundância relativa de espécies de bactérias das classes Bacteroidia e Clostridia, ambas fermentam o carboidrato não digerível, a redução leva a menor produção de ácidos graxos de cadeia curta que são os principais metabólitos da microbiota intestinal, que poderiam promover a função de barreira e manter um ambiente saudável e levemente ácido no cólon (YANG; YAN; ZHANG, *et al* 2020).

Os valores de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas (Tab. S4) de todos os tratamentos variaram dentro dos intervalos de referência para leitões jovens conforme preconizado por Perri, O'Sullivan (79). O que indica que os animais estavam, de maneira geral, em bom estado de saúde e sob ausência de anemia. Semelhantemente, Zhang,

Rolando (80) não observaram efeito significativo da suplementação de 40 ppm de óleos funcionais de Orégano no estado hematológico de leitões desmamados.

A diferença nos leucócitos circulantes em suínos pode estar associada a dois fatores em específico: estado inflamatório ou a estado de estresse, causados durante o período de desmame (81)

Em um estudo com ratos sob estresse, foi possível observar o aumento dos níveis de leucócitos inflamatórios circulantes por estimulação direta da proliferação de células-tronco hematopoiéticas (82). Semelhantemente, em suínos foi demonstrado que alguns tipos de estressores aumentaram a contagem total de leucócitos e a proliferação de células T (83).

Em outro estudo, avaliando parâmetros hematológicos em leitões desafiados por *Salmonella*, Burdick Sanchez, Carroll (84) não encontraram diferenças significativas nas concentrações deste gênero nas fazes dos animais, e sugeriram que as variações nos parâmetros hematológicos, naquele estudo, estariam mais relacionadas a um estado de estresse do que à infecção real por este agente patogênico.

Por outro lado, o aumento da porcentagem de linfócitos no sangue em leitões desafiados por *Escherichia coli* enterotoxigênica (85, 86) foi associado a mudança no estado inflamatório destes animais, decorrente do desafio. Comportamento contrário foi observado neste estudo para o grupo mistura, sugerindo que este pode ter atuado mitigando a infecção por *E. coli*.

O intestino é o maior órgão imunológico do corpo e, como tal, é o local para a maioria dos linfócitos e células efectoras imunológicas com receptores de reconhecimento de padrões (87). Receptores de reconhecimento padrão (PPRs), como Toll-like, RIG-1-like, entre outros, atuam na mediação da defesa inata do hospedeiro na mucosa para manter a homeostase comensal e da barreira intestinal (88).

Além disso, sabe-se que um dos primeiros indicadores de um estado de infecção é o desempenho zootécnico comprometido, porque os animais doentes geralmente reduzem ou eliminam o consumo de ração. Isso não se evidenciou no estudo atual, no qual o consumo de ração foi semelhante em todos os tratamentos, com especial atenção para o grupo de óleos funcionais que apresentou, em média, menor consumo de ração e menor conversão alimentar e maior peso vivo ao final do experimento.

Conclusão

. Os animais que receberam probióticos apresentaram desempenho intermediário e os leitões que não receberam dietas com aditivos apresentaram piores índices de desempenho. A utilização da mistura de óleos funcionais melhorou a conversão alimentar e modulou a microbiota estabilizando famílias benéficas e reduzindo a concentração de *Campylobacter* e *Escherichia coli* nas fezes dos leitões.

Referências

1. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *Journal of animal science and biotechnology*. 2013;4(1):1-4.
2. Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*. 2018;4(2):126-36.
3. Pan L, Zhao P, Ma X, Shang Q, Xu Y, Long S, et al. Probiotic supplementation protects weaned pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge and improves performance similar to antibiotics. *Journal of animal science*. 2017;95(6):2627-39.
4. Cairo PLG, Gois FD, Sbardella M, Silveira H, de Oliveira RM, Allaman IB, et al. Effects of dietary supplementation of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs. *Journal*

of the Science of Food and Agriculture. 2018;98(2):541-8.

5. Yi H, Zhang L, Gan Z, Xiong H, Yu C, Du H, et al. High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine. *Scientific reports*. 2016;6:25679.
6. Langemeier A, Morton J, Scotten S, Thayer M, Nelssen J. Effects of a Combination of Essential Oils (Victus LIV), Increased Zinc Oxide and Copper Sulfate, or Their Combination in Nursery Diets on Pig Performance. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*. 2017;3(7):27.
7. Dowarah R, Verma A, Agarwal N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition*. 2017;3(1):1-6.
8. Hu Y, Dun Y, Li S, Zhang D, Peng N, Zhao S, et al. Dietary *Enterococcus faecalis* LAB31 improves growth performance, reduces diarrhea, and increases fecal *Lactobacillus* number of weaned piglets. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116635.
9. Xu H, Wei Y, Ma H, Liu Y, Zhang Y, Hu L, et al. Alterations of Gut Microbiome in the Patients With Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2315.
10. Hu S, Wang L, Jiang Z. Dietary additive probiotics modulation of the intestinal microbiota. *Protein and peptide letters*. 2017;24(5):382-7.
11. Ahmed ST, Hoon J, Mun H-S, Yang C-J. Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus*-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *African Journal of Microbiology Research*. 2014;8(1):96-104.
12. Murakami A, Eyng C, Torrent J. Effects of functional oils on coccidiosis and apparent metabolizable energy in broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2014;27(7):981.
13. Alagawany M, Abd El-Hack M, Farag M, Shaheen H, Abdel-Latif M, Noreldin A, et

- al. The usefulness of oregano and its derivatives in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*. 2018;74(3):463-74.
14. Marsiglio BN. Óleos funcionais em dieta alto grão para ovinos e efeitos sobre o desempenho, a digestibilidade dos nutrientes e características da carcaça. 2012.
15. Muzaffar S, Chattoo BB. Apoptosis-inducing factor (Aif1) mediates anacardic acid-induced apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis*. 2017;22(3):463-74.
16. Guimarães DO, Momesso LdS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*. 2010;33(3):667-79.
17. Moraes P, Andretta I, Cardinal K, Ceron M, Vilella L, Borille R, et al. Effect of functional oils on the immune response of broilers challenged with *Eimeria* spp. *animal*. 2019b;13(10):2190-8.
18. Vieira AM, Soratto TAT, Cardinal KM, Wagner G, Hauptli L, Lima ALF, et al. Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with monensin or functional oils in response to challenge by *Eimeria* spp. *PloS one*. 2020;15(8):e0237118.
19. Rostagno HS. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.: Universidade Federal de Viçosa 2017.
20. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2017;81(4).
21. Christoff AP, Sereia AFR, Boberg D, Moraes R, Oliveira L. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies*. 2017;25.
22. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al.

Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*. 2019;37(8):852-7.

23. Wickham H. The split-apply-combine strategy for data analysis. *Journal of Statistical Software*. 2011;40(1):1-29.

24. Wickham H. Reshaping data with the reshape package. *Journal of statistical software*. 2007;21(12):1-20.

25. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*. 2013;8(4):e61217.

26. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'hara R, et al. Community ecology package. R package version. 2011:2.0-2.

27. Perry M. Flexible Heatmaps for Functional Genomics and Sequence Feature S. R Package Version 100. 2019.

28. Dusa A. Venn: Draw venn diagrams. R package version 1.7. 2018.

29. Gehlenborg N. UpSetR: a more scalable alternative to Venn and Euler diagrams for visualizing intersecting sets. R package version 1.4.0. 2016.

30. Lalles J-P, Bosi P, Smidt H, Stokes CR. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007;66(2):260-8.

31. Ri C-S, Jiang X-R, Kim M-H, Wang J, Zhang H-J, Wu S-G, et al. Effects of dietary oregano powder supplementation on the growth performance, antioxidant status and meat quality of broiler chicks. *Italian Journal of Animal Science*. 2017;16(2):246-52.

32. Simitzis PE. Enrichment of animal diets with essential oils—a great perspective on improving animal performance and quality characteristics of the derived products. *Medicines*. 2017;4(2):35.

33. Tian Q, Piao X. Essential Oil Blend Could Decrease Diarrhea Prevalence by Improving Antioxidative Capability for Weaned Pigs. *Animals*. 2019;9(10):847.

34. He X, Hao D, Liu C, Zhang X, Xu D, Xu X, et al. Effect of supplemental oregano essential oils in diets on production performance and relatively intestinal parameters of laying hens. *American Journal of Molecular Biology*. 2017;7(01):73.
35. Zeng Z, Xu X, Zhang Q, Li P, Zhao P, Li Q, et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. *Animal Science Journal*. 2015;86(3):279-85.
36. Su G, Zhou X, Wang Y, Chen D, Chen G, Li Y, et al. Effects of plant essential oil supplementation on growth performance, immune function and antioxidant activities in weaned pigs. *Lipids in health and disease*. 2018;17(1):139.
37. Lan R, Koo J, Kim I. Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbiota shedding, and fecal noxious gas emission in weaning pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2016;219:181-8.
38. Hu J, Wei Z, Weidner S, Friman V-P, Xu Y-C, Shen Q-R, et al. Probiotic *Pseudomonas* communities enhance plant growth and nutrient assimilation via diversity-mediated ecosystem functioning. *Soil Biology and Biochemistry*. 2017;113:122-9.
39. Moraes P, Cardinal K, Gouvêa F, Schroeder B, Ceron M, Lunedo R, et al. Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. *Poultry science*. 2019a;98(11):5456-64.
40. Li Y, Fu X, Ma X, Geng S, Jiang X, Huang Q, et al. Intestinal microbiome-Metabolome responses to essential oils in piglets. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:1988.
41. Luise D, Bertocchi M, Motta V, Salvarani C, Bosi P, Luppi A, et al. *Bacillus* sp. probiotic supplementation diminish the *Escherichia coli* F4ac infection in susceptible weaned pigs by influencing the intestinal immune response, intestinal microbiota and blood

metabolomics. *Journal of animal science and biotechnology*. 2019;10(1):74.

42. Mes TH. Microbial diversity—insights from population genetics. *Environmental microbiology*. 2008;10(1):251-64.

43. Kim J, Nguyen SG, Guevarra RB, Lee I, Unno T. Analysis of swine fecal microbiota at various growth stages. *Archives of microbiology*. 2015;197(6):753-9.

44. Zhao W, Wang Y, Liu S, Huang J, Zhai Z, He C, et al. The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PloS one*. 2015;10(2):e0117441.

45. Han GG, Lee J-Y, Jin G-D, Park J, Choi YH, Kang S-K, et al. Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-9.

46. Salaheen S, Kim S-W, Haley BJ, Van Kessel JAS, Biswas D. Alternative growth promoters modulate broiler gut microbiome and enhance body weight gain. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2088.

47. Pajarillo EAB, Chae J-P, Balolong MP, Kim HB, Kang D-K. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *The Journal of general and applied microbiology*. 2014;60(4):140-6.

48. Betancourt L, Hume M, Rodríguez F, Nisbet D, Sohail MU, Afanador-Tellez G. Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. *Poultry science*. 2019;98(10):4777-86.

49. Lapébie P, Lombard V, Drula E, Terrapon N, Henrissat B. Bacteroidetes use thousands of enzyme combinations to break down glycans. *Nature communications*. 2019;10(1):1-7.

50. Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied microbiology and biotechnology*.

2014;98(10):4301-10.

51. Flint HJ, Duncan S. *Bacteroides* and *Prevotella*. 2014.
52. Sheridan PO, Martin JC, Lawley TD, Browne HP, Harris HM, Bernalier-Donadille A, et al. Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microbial Genomics*. 2016;2(2).
53. Niu Q, Li P, Hao S, Zhang Y, Kim SW, Li H, et al. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. *Scientific reports*. 2015;5:9938.
54. Rizzatti G, Lopetuso L, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed research international*. 2017;2017.
55. Sun J, Du L, Li X, Zhong H, Ding Y, Liu Z, et al. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-10.
56. Wang J, Han Y, Meng F, Zhao J, Zhou Z, Fan H. Fecal microbiota succession of piglets from birth to post-weaning by 454 pyrosequencing analysis. *Transactions of Tianjin University*. 2017;23(3):211-20.
57. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*. 2017;19(1):29-41.
58. Ze X, Le Mougou F, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Some are more equal than others: the role of “keystone” species in the degradation of recalcitrant substrates. *Gut Microbes*. 2013;4(3):236-40.
59. Zhong X, Zhang Z, Wang S, Cao L, Zhou L, Sun A, et al. Microbial-driven butyrate regulates jejunal homeostasis in piglets during the weaning stage. *Frontiers in microbiology*. 2019;9:3335.
60. Whitehead R, Young G, Bhathal P. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut*. 1986;27(12):1457-63.

61. Dibner J, Buttin P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*. 2002;11(4):453-63.
62. Feng W, Wu Y, Chen G, Fu S, Li B, Huang B, et al. Sodium butyrate attenuates diarrhea in weaned piglets and promotes tight junction protein expression in colon in a GPR109A-dependent manner. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;47(4):1617-29.
63. Johansson ME, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(10):639-49.
64. Yang H, Huang X, Fang S, He M, Zhao Y, Wu Z, et al. Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1555.
65. Zhang L, Wu W, Lee Y-K, Xie J, Zhang H. Spatial heterogeneity and co-occurrence of mucosal and luminal microbiome across swine intestinal tract. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:48.
66. Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier G, Denis C, et al. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental microbiology reports*. 2015;7(3):554-69.
67. Chen L, Xu Y, Chen X, Fang C, Zhao L, Chen F. The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1688.
68. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in microbiology*. 2017;25(10):851-73.
69. Fohse J, Zijlstra R, Willing B. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*. 2016;6(3):30-6.

70. Yang C, Cao G, Ferket P, Liu T, Zhou L, Zhang L, et al. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry science*. 2012;91(9):2121-9.
71. Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, Orpianesi C, Cecchini C, Cresci A. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*. 2009;48(6):355-63.
72. Dowarah R, Verma A, Agarwal N, Patel B, Singh P. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. *Livestock Science*. 2017;195:74-9.
73. Chung YW, Gwak H-J, Moon S, Rho M, Ryu J-H. Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses. *Plos one*. 2020;15(1):e0227886.
74. Smith BJ, Miller RA, Ericsson AC, Harrison DC, Strong R, Schmidt TM. Changes in the gut microbiota and fermentation products associated with enhanced longevity in acarbose-treated mice. *BioRxiv*. 2018:311456.
75. Ragupathi ND, Sethuvel DM, Inbanathan F, Veeraraghavan B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New microbes and new infections*. 2018;21:58-62.
76. Li S, Ru Y, Liu M, Xu B, Péron A, Shi X. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science*. 2012b;145(1-3):119-23.
77. Yang C, Zhang L, Cao G, Feng J, Yue M, Xu Y, et al. Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. *Journal of Animal Science*. 2019;97(1):133-43.

78. Gómez-García M, Sol C, de Nova PJ, Puyalto M, Mesas L, Puente H, et al. Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine Health Management*. 2019;5(1):1-8.
79. Perri AM, O'Sullivan TL, Harding JC, Wood RD, Friendship RM. Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. *The Canadian Veterinary Journal*. 2017;58(4):371.
80. Zhang Z, Rolando A, Kim I. Effects of benzoic acid, essential oils and *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbiota and faecal noxious gas emission in weanling pigs. *Journal of applied animal research*. 2016;44(1):173-9.
81. Gimsa U, Tuchscherer M, Kanitz E. Psychosocial stress and immunity—what can we learn from pig studies? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2018;12:64.
82. Heidt T, Sager HB, Courties G, Dutta P, Iwamoto Y, Zaltsman A, et al. Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nature medicine*. 2014;20(7):754-8.
83. Salak-Johnson JL, Webb SR. Pig social status and chronic cold or crowd stressors differentially impacted immune response. *Open Journal of Animal Sciences*. 2018;8(03):280.
84. Burdick Sanchez NC, Carroll JA, Corley JR, Broadway PR, Callaway TR. Changes in the hematological variables in pigs supplemented with yeast cell wall in response to a *Salmonella* challenge in weaned pigs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019;6:246.
85. Peng X, Wang R, Hu L, Zhou Q, Liu Y, Yang M, et al. *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 administration improves the intestinal health and immunity in neonatal piglets infected by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Journal of animal science and biotechnology*. 2019;10(1):72.
86. Tian Z, Liu X, Dai R, Xiao Y, Wang X, Bi D, et al. *Enterococcus faecium* HDRsEf1 protects the intestinal epithelium and attenuates ETEC-induced IL-8 secretion in enterocytes.

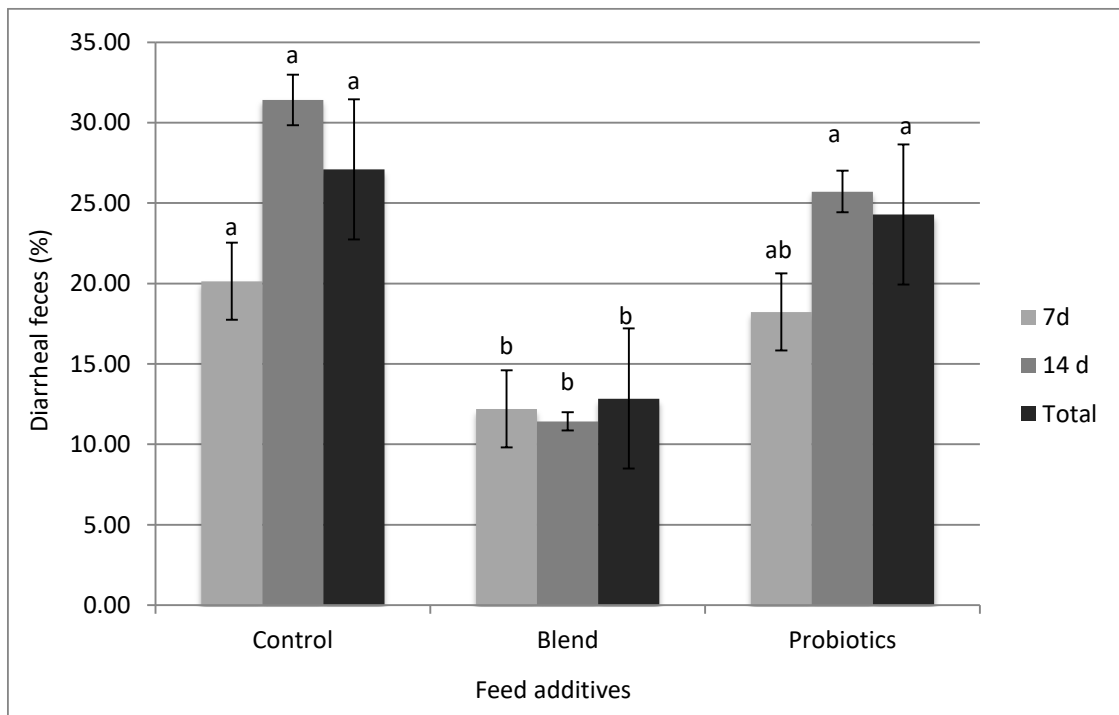
Mediators of inflammation. 2016;2016.

87. Kelly D, Coutts A. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2000;59(2):177-85.

88. Kim CH. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology*. 2018;154(2):220-9.

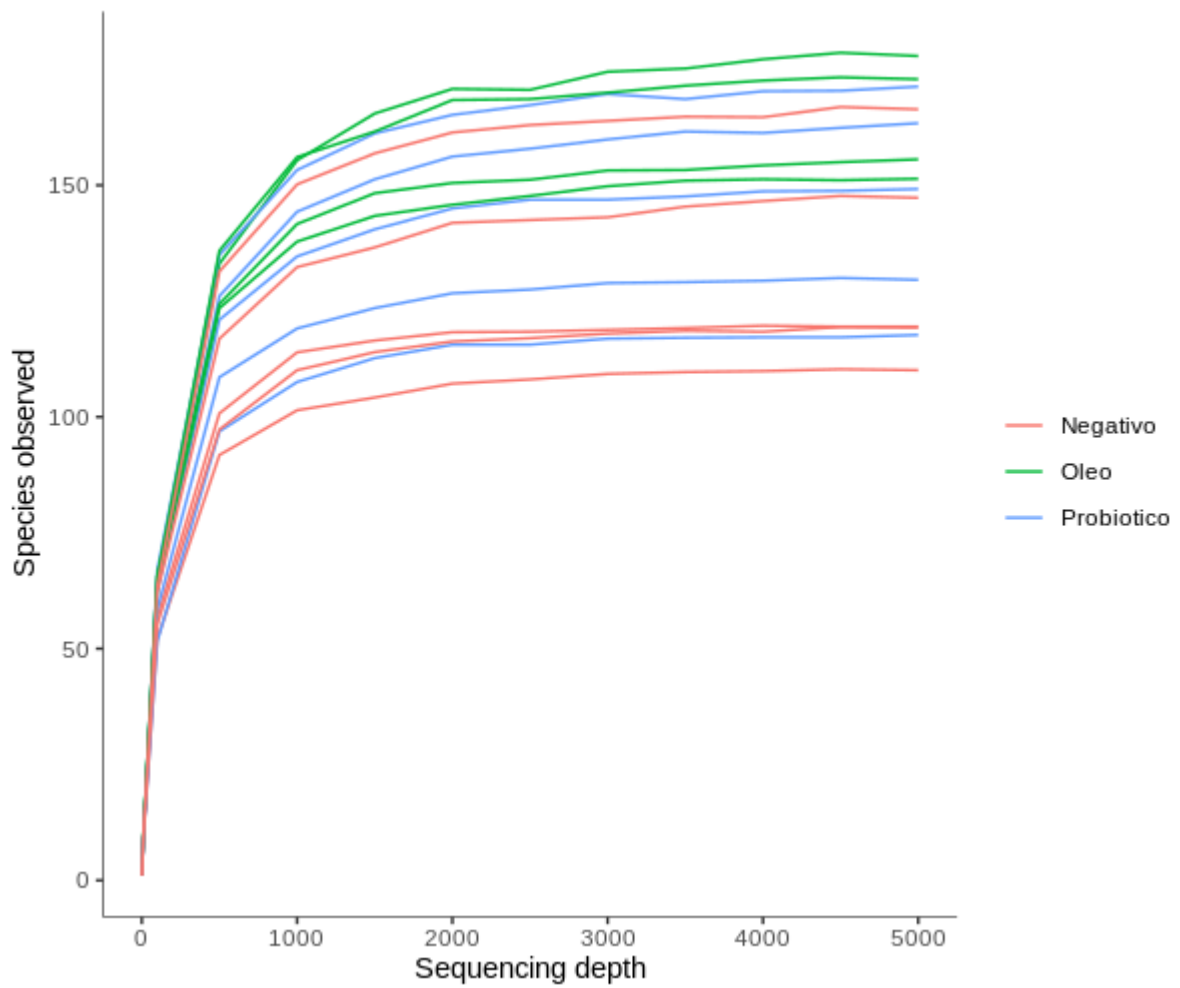
Informações de Apoio

Figura S1- Frequência de fezes diarreicas ao longo de duas semanas e no período total submetidos a quatro dietas experimentais na fase de creche.



^{ab} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

Figura S2. Curva de rarefação das catorze amostras do experimento compostas por dois aditivos alimentares, dieta basal (controle), Óleos Funcionais (Blend), ou Probióticos.



Eixo horizontal: a quantidade de dados efetivos de sequenciamento (profundidade de rarefação); eixo vertical: o número observado de variações de amplificação de sequência (ASVs).

Figura S3. Concentração de *Escherichia Coli* na nas fezes de leitões aos 50 dias de idade recebendo diferentes aditivos.

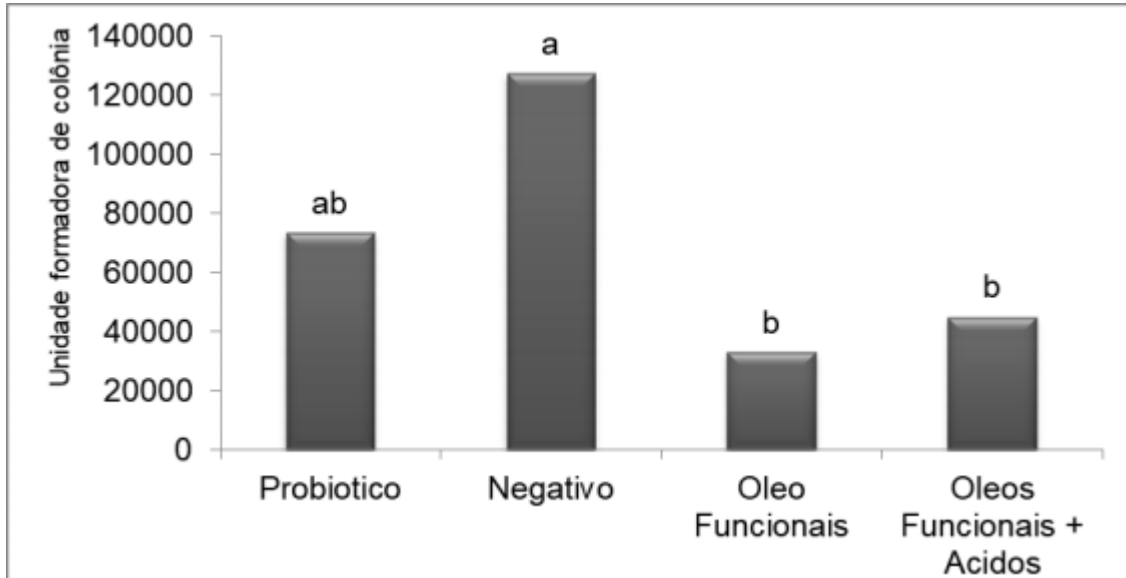


Tabela S 1 - Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Fase 1 - 28 a 43 dias	Fase 2- 43 a 57 dias	Fase 3 - 57 a 66 dias
Milho 7,86 %	54,79	54,83	58,37
Farelo soja 45 %	22,47	29,25	27,58
Núcleo para suínos*	10,00	10,00	0,50
Farinha carne ossos 46	0,00	0,00	8,00
Oleo soja	2,9	2,91	3,65
L-Lisina HCl	0,02	0,03	0,40
L-Treonina	0,01	0,02	0,16
DL-Metionina	0,00	0,00	0,09
plasma suíno	5,00	0,50	0,00
Açúcar	2,00	0,00	0,00
Calcario calcítico	1,72	1,65	0,17
Fosfato bicalcico	0,38	0,00	0,00
Sal comum	0,00	0,11	0,38
Adsorvente de micotoxinas	0,10	0,10	0,10
Aditivo*	0,45	0,4	0,4
Composição analisada			

Energia Metabolizável Kcal/kg	3400	3375	3350
Proteína Bruta(%)	19,5	19,35	21,25
Lisina Dig. (%)	1,45	1,35	1,25
Metionina Dig. (%)	0,45	0,45	0,36
Treonina Dig. (%)	0,97	0,9	0,81
Triptofano Dig. (%)	0,27	0,26	0,2
Cálcio(%)	1,07	0,97	1,1
Fósforo digestível(%)	0,53	0,5	0,77
Sódio (%)	0,32	0,22	0,22
Cloro (%)	0,06	0,13	0,34
Potássio (%)	0,62	0,71	0,74
Fibra bruta (%)	2,24	2,6	2,47

*Núcleo para suínos: ácido fólico 14mg/kg, metionina 21g; ácido pantotênico 295mg/kg; niacina 300mg/kg; biotina 1,0mg/kg; proteína bruta 40g/kg; cálcio (mín-máx) 25 - 45g/kg; sódio 15 g/kg; cobalto 4,5mg/kg; selênio 4mg/kg; cobre 1.200mg/kg; treonina 28 g/kg; colina 4.500 mg/kg; triptofano 5.600 g/kg; cromo 2mg/kg; umidade (máx) 130 g/kg; extrato etéreo 1.000mg/kg; vitamina A 120.000ui/kg; ferro 800mg/kg; vitamina B1 18mg/kg; fibra bruta 10g/kg; vitamina B12 280mcg/kg; fitase 5.000FTU/kg; vitamina B2 50mg/kg; fósforo 20g/kg; vitamina B6 50mg/kg; iodo 13 mg/kg; vitamina D3 19.000UI/kg; lisina 45 g/kg; vitamina E 850UI/kg; manganês 650mg/kg; vitamina K3 23mg/kg; matéria mineral 300g/kg; zinco 18,5g/kg

* Aditivos de acordo com os tratamentos. Controle: sem aditivos; *Oils*: 0,15% Integrity_Oligo + 0,20% Essencial_Oligo; Probiotics: 0,60%

Tabela S 2. Lê-se o número que passou por cada etapa do controle de qualidade para as quinze amostras do experimento compostas por dois aditivos alimentares, dieta basal (controle), óleos funcionais (óleos) ou Probióticos.

Id de amostra	Dados não	Filtrado	Denoised	Não químérico	Tratamento
----------------------	------------------	-----------------	-----------------	----------------------	-------------------

	tratados				
181113520743-1-1-1	114735	104376	85818	80076	Óleos
181113520744-1-1-1	120895	109479	95367	89960	Probioticos
181113520746-1-1-1	100502	91263	78574	75338	Óleos
181113520747-1-1-1	96059	83542	73782	55246	Controle
181113520749-1-1-1	92071	83806	69410	62233	Probioticos
181113520750-1-1-1	92948	82713	70171	59638	Controle
181113520751-1-1-1	118066	106326	92716	73696	Probioticos
181113520752-1-1-1	106856	97730	84318	74525	Óleos
181113520754-1-1-1	105837	96475	85212	72571	Controle
181113520755-1-1-1	84557	77308	68883	61903	Probioticos
181113520756-1-1-1	108242	96964	83083	78408	Óleos
181113520758-1-1-1	87856	79741	65579	54996	Probioticos
181113520759-1-1-1	111268	101191	88365	78985	Controle
181113520761-1-1-1	22074	19481	13689	13159	Óleos
181113520762-1-1-1	65701	59793	48619	43679	Controle

Tabela S3. Abundância relativa de filo, classe, ordem, família e gêneros presentes na microbiota intestinal de leitões desmamados.

Phylum	Control (Median)	Control (SD)	Oils (Median)	Oils (SD)	Probiotics (Median)	Probiotics (SD)	Kruskal-Wallis chi-squared	P-value
Euryarchaeota	0,0000	0,0000	0,0005	0,0010	0,0000	0,0008	3,0204	0,2209
Actinobacteria	0,0176	0,0060	0,0154	0,0132	0,0278	0,0181	1,1400	0,5655
Bacteroidetes	0,1977	0,0491	0,1799	0,0390	0,1623	0,0295	1,9629	0,3748
Cyanobacteria	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0014	2,2072	0,3317
Epsilonbacteraeota	0,0000	0,0012	0,0000	0,0005	0,0000	0,0015	0,4494	0,7988
Fibrobacteres	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Firmicutes	0,7669	0,0546	0,7741	0,0527	0,8178	0,0330	1,9714	0,3732
Patescibacteria	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Proteobacteria	0,0019	0,0012	0,0045	0,0056	0,0014	0,0092	0,5469	0,7608
Spirochaetes	0,0016	0,0010	0,0021	0,0020	0,0008	0,0019	3,4793	0,1756
Tenericutes	0,0142	0,0107	0,0189	0,0084	0,0052	0,0027	2,5657	0,2772
Class								
Methanobacteria	0,0000	0,0000	0,0005	0,0010	0,0000	0,0008	3,0204	0,2209
Actinobacteria	0,0000	0,0005	0,0027	0,0033	0,0014	0,0089	3,1767	0,2043
Coriobacteriia	0,0165	0,0060	0,0114	0,0114	0,0204	0,0110	1,0714	0,5853
Bacteroidia	0,1977	0,0491	0,1799	0,0390	0,1623	0,0295	1,9629	0,3748
Melainabacteria	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0014	2,2072	0,3317

Campylobacteria	0,0000	0,0012	0,0000	0,0005	0,0000	0,0015	0,4494	0,7988
Fibrobacteria	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Bacilli	0,0830	0,0728	0,0451	0,0263	0,0447	0,0174	3,2657	0,1954
Clostridia	0,5686	0,0528	0,6385	0,0787	0,6532	0,0448	3,1029	0,2119
Erysipelotrichia	0,0507	0,0265	0,0647	0,0254	0,0472	0,0148	0,6000	0,7408
Negativicutes	0,0545	0,0391	0,0330	0,0208	0,0623	0,0297	1,9857	0,3705
Saccharimonadia	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Deltaproteobacteria	0,0000	0,0012	0,0005	0,0009	0,0000	0,0013	0,5110	0,7745
Gammaproteobacteria	0,0000	0,0010	0,0041	0,0047	0,0014	0,0080	1,4741	0,4785
Spirochaetia	0,0016	0,0010	0,0021	0,0020	0,0008	0,0019	3,4793	0,1756
Mollicutes	0,0142	0,0107	0,0189	0,0084	0,0052	0,0027	2,5657	0,2772
Unknown	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	1,8000	0,4066
Family								
Methanobacteriaceae	0,0000	0,0000	0,0005	0,0010	0,0000	0,0008	3,0204	0,2209
Bifidobacteriaceae	0,0000	0,0005	0,0027	0,0033	0,0014	0,0089	3,1767	0,2043
Atopobiaceae	0,0081	0,0048	0,0053	0,0082	0,0093	0,0092	0,8657	0,6487
Coriobacteriaceae	0,0050	0,0019	0,0045	0,0028	0,0066	0,0014	3,3429	0,1880
Eggerthellaceae	0,0033	0,0018	0,0034	0,0012	0,0024	0,0017	1,2628	0,5319
Bacteroidaceae	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Bacteroidales RF16 group	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Muribaculaceae	0,0968	0,0216	0,0818	0,0330	0,0540	0,0180	4,4857	0,1062

p-251-o5	0,0000	0,0022	0,0035	0,0083	0,0000	0,0000	6,0977	0,0474
p-2534-18B5 gut group	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,8769	0,6450
Prevotellaceae	0,0603	0,0370	0,0801	0,0167	0,0778	0,0241	0,3600	0,8353
Rikenellaceae	0,0140	0,0067	0,0178	0,0085	0,0130	0,0049	0,5000	0,7788
Tannerellaceae	0,0000	0,0073	0,0034	0,0023	0,0032	0,0021	1,7403	0,4189
uncultured	0,0000	0,0038	0,0000	0,0015	0,0017	0,0015	2,1804	0,3362
Gastranaerophilales uncultured bacterium	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0015	1,2019	0,5483
Campylobacteraceae	0,0000	0,0012	0,0000	0,0005	0,0000	0,0015	0,4494	0,7988
Fibrobacteraceae	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Enterococcaceae	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Lactobacillaceae	0,0796	0,0713	0,0414	0,0269	0,0439	0,0210	3,2657	0,1954
Streptococcaceae	0,0041	0,0030	0,0046	0,0027	0,0030	0,0051	0,1124	0,9453
Christensenellaceae	0,0111	0,0119	0,0096	0,0053	0,0013	0,0166	1,9889	0,3699
Clostridiaceae 1	0,0263	0,0131	0,0405	0,0207	0,0355	0,0223	2,3829	0,3038
Clostridiales vadinBB60 group	0,0000	0,0000	0,0005	0,0007	0,0009	0,0019	3,8573	0,1453
Defluviitaleaceae	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Family XIII	0,0265	0,0077	0,0386	0,0118	0,0165	0,0060	5,7114	0,0575
Lachnospiraceae	0,2063	0,0183	0,2028	0,0247	0,1863	0,0175	1,0029	0,6057
Peptococcaceae	0,0000	0,0020	0,0005	0,0010	0,0024	0,0015	2,7173	0,2570

Peptostreptococcaceae	0,0107	0,0050	0,0169	0,0088	0,0222	0,0112	0,3857	0,8246
Ruminococcaceae	0,2903	0,0439	0,3194	0,0291	0,3735	0,0215	5,3229	0,0698
Erysipelotrichaceae	0,0507	0,0265	0,0647	0,0254	0,0472	0,0148	0,6000	0,7408
Acidaminococcaceae	0,0062	0,0046	0,0095	0,0031	0,0122	0,0060	2,8314	0,2428
Veillonellaceae	0,0500	0,0357	0,0236	0,0185	0,0430	0,0271	2,1429	0,3425
Saccharimonadaceae	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
uncultured rumen bacterium	0,0000	0,0012	0,0000	0,0005	0,0000	0,0013	0,0111	0,9945
Desulfovibrionaceae	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Succinivibrionaceae	0,0000	0,0000	0,0041	0,0042	0,0014	0,0071	5,1588	0,0758
Enterobacteriaceae	0,0000	0,0010	0,0000	0,0007	0,0000	0,0009	0,4673	0,7916
Spirochaetaceae	0,0016	0,0010	0,0021	0,0020	0,0008	0,0019	3,4793	0,1756
metagenome	0,0016	0,0030	0,0000	0,0013	0,0000	0,0014	1,3621	0,5061
Mollicutes RF39 uncultured bacterium	0,0012	0,0031	0,0010	0,0017	0,0000	0,0015	0,4105	0,8144
uncultured Lachnospiraceae bacterium	0,0000	0,0045	0,0010	0,0017	0,0000	0,0000	2,8869	0,2361
uncultured organism	0,0000	0,0007	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	1,2019	0,5483
unidentified rumen bacterium RF39	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Unknown	0,0075	0,0072	0,0181	0,0086	0,0052	0,0031	3,9344	0,1399

Genus								
Methanobrevibacter	0,0000	0,0000	0,0005	0,0010	0,0000	0,0008	3,0204	0,2209
Bifidobacterium	0,0000	0,0005	0,0027	0,0033	0,0014	0,0089	3,1767	0,2043
Libanicoccus	0,0025	0,0028	0,0000	0,0016	0,0000	0,0035	1,0381	0,5951
Atopobiaceae metagenome	0,0000	0,0000	0,0000	0,0037	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Olsenella	0,0027	0,0062	0,0000	0,0085	0,0082	0,0103	1,2636	0,5316
Atopobiaceae uncultured	0,0000	0,0010	0,0000	0,0008	0,0000	0,0006	0,1177	0,9429
Collinsella	0,0050	0,0019	0,0045	0,0028	0,0066	0,0014	3,3429	0,1880
Enterorhabdus	0,0017	0,0012	0,0021	0,0014	0,0015	0,0013	0,3747	0,8292
Senegalimassilia	0,0000	0,0011	0,0006	0,0008	0,0000	0,0009	0,3066	0,8579
Slackia	0,0000	0,0004	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	1,2019	0,5483
Eggerthellaceae uncultured	0,0000	0,0004	0,0008	0,0010	0,0000	0,0007	2,0172	0,3647
Bacteroides	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Bacteroidales RF16 group uncultured bacterium	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Muribaculaceae metagenome	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	1,9362	0,3798
Muribaculaceae uncultured bacterium	0,0171	0,0112	0,0164	0,0140	0,0049	0,0034	7,5629	0,0228
uncultured Porphyromonadaceae	0,0654	0,0250	0,0450	0,0238	0,0390	0,0099	0,9657	0,6170

bacterium								
p-251-o5 uncultured bacterium	0,0000	0,0022	0,0035	0,0083	0,0000	0,0000	6,0977	0,0474
p-2534-18B5 gut group uncultured bacterium	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,8769	0,6450
Alloprevotella	0,0025	0,0049	0,0071	0,0069	0,0053	0,0024	1,8068	0,4052
Prevotella 1	0,0026	0,0018	0,0023	0,0013	0,0020	0,0050	0,1293	0,9374
Prevotella 2	0,0066	0,0034	0,0068	0,0012	0,0050	0,0031	1,3057	0,5206
Prevotella 7	0,0000	0,0054	0,0010	0,0015	0,0028	0,0050	0,6190	0,7338
Prevotella 9	0,0073	0,0187	0,0141	0,0060	0,0257	0,0123	3,2400	0,1979
Prevotellaceae NK3B31 group	0,0116	0,0053	0,0165	0,0029	0,0102	0,0094	4,3829	0,1118
Prevotellaceae UCG-001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	1,8000	0,4066
Prevotellaceae UCG-003	0,0110	0,0078	0,0118	0,0030	0,0097	0,0066	0,5914	0,7440
Prevotellaceae uncultured	0,0000	0,0006	0,0000	0,0007	0,0020	0,0034	8,5559	0,0139
Alistipes	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
dgA-11 gut group	0,0000	0,0015	0,0012	0,0017	0,0000	0,0000	2,6055	0,2718
Rikenellaceae RC9 gut group	0,0114	0,0068	0,0162	0,0067	0,0130	0,0049	0,7057	0,7027
Parabacteroides	0,0000	0,0073	0,0034	0,0023	0,0032	0,0021	1,7403	0,4189
Gastranaerophilales	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0015	1,2019	0,5483

uncultured bacterium								
Campylobacter	0,0000	0,0012	0,0000	0,0005	0,0000	0,0015	0,4494	0,7988
Fibrobacter	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Enterococcus	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Lactobacillus	0,0796	0,0713	0,0414	0,0269	0,0439	0,0210	3,2657	0,1954
Streptococcus	0,0041	0,0030	0,0046	0,0027	0,0030	0,0051	0,1124	0,9453
Christensenellaceae R-7 group	0,0111	0,0119	0,0096	0,0053	0,0013	0,0166	1,9889	0,3699
Clostridium sensu stricto 1	0,0263	0,0135	0,0386	0,0198	0,0344	0,0207	1,9714	0,3732
Clostridium sensu stricto 6	0,0000	0,0013	0,0012	0,0017	0,0010	0,0053	2,8737	0,2377
Clostridiales vadinBB60 group uncultured organism	0,0000	0,0000	0,0005	0,0007	0,0000	0,0013	2,6055	0,2718
Defluviitaleaceae UCG- 011	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
[Eubacterium] nodatum group	0,0000	0,0000	0,0007	0,0011	0,0000	0,0000	5,3846	0,0677
Family XIII AD3011 group	0,0128	0,0115	0,0180	0,0040	0,0121	0,0056	1,1829	0,5535
Family XIII UCG-001	0,0014	0,0004	0,0013	0,0007	0,0000	0,0006	7,0044	0,0301
Mogibacterium	0,0108	0,0037	0,0164	0,0104	0,0061	0,0032	3,4714	0,1763
[Eubacterium] eligens group	0,0000	0,0027	0,0026	0,0031	0,0000	0,0018	0,7101	0,7011

[Eubacterium] fissicatena group	0,0000	0,0043	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
[Eubacterium] hallii group	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
[Eubacterium] ruminantium group	0,0000	0,0037	0,0032	0,0022	0,0000	0,0019	2,2313	0,3277
[Ruminococcus] gauvreauii group	0,0093	0,0094	0,0048	0,0085	0,0000	0,0036	2,4914	0,2877
[Ruminococcus] torques group	0,0066	0,0072	0,0082	0,0037	0,0102	0,0027	1,2885	0,5250
Agathobacter	0,0000	0,0069	0,0000	0,0000	0,0103	0,0147	4,0255	0,1336
Blautia	0,0459	0,0156	0,0295	0,0116	0,0374	0,0088	1,1829	0,5535
Coprococcus 1	0,0298	0,0104	0,0127	0,0153	0,0157	0,0120	1,0000	0,6065
Coprococcus 2	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	0,8769	0,6450
Coprococcus 3	0,0091	0,0080	0,0129	0,0044	0,0085	0,0066	0,7257	0,6957
Dorea	0,0126	0,0132	0,0115	0,0038	0,0110	0,0053	0,7057	0,7027
Fusicatenibacter	0,0000	0,0068	0,0000	0,0021	0,0000	0,0033	0,8033	0,6692
Howardella	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Lachnoclostridium	0,0116	0,0073	0,0000	0,0024	0,0000	0,0022	3,1937	0,2025
Lachnospira	0,0019	0,0066	0,0069	0,0040	0,0065	0,0045	1,4960	0,4733
Lachnospiraceae AC2044 group	0,0000	0,0000	0,0042	0,0041	0,0000	0,0038	5,4073	0,0670

Lachnospiraceae FCS020 group	0,0000	0,0041	0,0000	0,0008	0,0000	0,0026	0,4673	0,7916
Lachnospiraceae ND3007 group	0,0000	0,0039	0,0035	0,0055	0,0000	0,0035	1,0478	0,5922
Lachnospiraceae NK3A20 group	0,0000	0,0032	0,0000	0,0027	0,0000	0,0034	0,0111	0,9945
Lachnospiraceae NK4A136 group	0,0000	0,0048	0,0089	0,0052	0,0100	0,0047	2,4924	0,2876
Lachnospiraceae UCG-004	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Lachnospiraceae XPB1014 group	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	1,8000	0,4066
Marvinbryantia	0,0045	0,0026	0,0048	0,0013	0,0062	0,0034	3,6031	0,1650
Moryella	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Oribacterium	0,0000	0,0028	0,0015	0,0032	0,0000	0,0027	0,6287	0,7303
Roseburia	0,0000	0,0027	0,0000	0,0000	0,0000	0,0089	2,2902	0,3182
Syntrophococcus	0,0000	0,0000	0,0000	0,0051	0,0000	0,0074	2,2072	0,3317
Lachnospiraceae uncultured	0,0020	0,0055	0,0047	0,0029	0,0017	0,0011	2,6490	0,2659
Peptococcus	0,0000	0,0020	0,0005	0,0010	0,0024	0,0015	2,7173	0,2570
[Eubacterium] coprostanoligenes group	0,0207	0,0128	0,0239	0,0107	0,0297	0,0096	0,1314	0,9364

Butyricococcus	0,0000	0,0000	0,0009	0,0029	0,0034	0,0020	5,3296	0,0696
Candidatus Soleaferrea	0,0000	0,0011	0,0024	0,0019	0,0023	0,0017	3,5170	0,1723
Caproiciproducens	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
Faecalibacterium	0,0211	0,0111	0,0298	0,0162	0,0701	0,0259	6,9417	0,0311
Fournierella	0,0107	0,0073	0,0127	0,0069	0,0117	0,0080	0,3714	0,8305
Intestinimonas	0,0033	0,0023	0,0023	0,0029	0,0000	0,0037	0,0586	0,9711
Negativibacillus	0,0034	0,0016	0,0032	0,0022	0,0035	0,0009	0,2029	0,9035
Oscillibacter	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0041	2,4894	0,2880
Oscillospira	0,0074	0,0090	0,0121	0,0045	0,0040	0,0073	1,3146	0,5182
Pygmaibacter	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	1,8000	0,4066
Ruminiclostridium 5	0,0028	0,0033	0,0070	0,0036	0,0053	0,0017	1,8029	0,4060
Ruminiclostridium 6	0,0016	0,0019	0,0018	0,0009	0,0000	0,0005	5,0979	0,0782
Ruminiclostridium 9	0,0000	0,0048	0,0043	0,0035	0,0033	0,0028	0,4403	0,8024
Ruminococcaceae NK4A214 group	0,0234	0,0124	0,0285	0,0062	0,0337	0,0090	2,7857	0,2484
Ruminococcaceae UCG- 002	0,0117	0,0094	0,0200	0,0053	0,0168	0,0127	0,6000	0,7408
Ruminococcaceae UCG- 003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Ruminococcaceae UCG- 004	0,0000	0,0020	0,0022	0,0026	0,0000	0,0029	0,8203	0,6635

Ruminococcaceae UCG-005	0,0402	0,0142	0,0555	0,0236	0,0417	0,0054	1,2857	0,5258
Ruminococcaceae UCG-008	0,0084	0,0069	0,0066	0,0046	0,0035	0,0042	1,3115	0,5190
Ruminococcaceae UCG-009	0,0018	0,0028	0,0021	0,0006	0,0018	0,0005	1,0714	0,5853
Ruminococcaceae UCG-010	0,0030	0,0031	0,0023	0,0010	0,0029	0,0019	0,1117	0,9457
Ruminococcaceae UCG-013	0,0000	0,0012	0,0000	0,0006	0,0000	0,0004	1,0591	0,5889
Ruminococcaceae UCG-014	0,0264	0,0153	0,0338	0,0093	0,0369	0,0128	0,1800	0,9139
Ruminococcus 1	0,0048	0,0028	0,0074	0,0052	0,0129	0,0081	5,5714	0,0617
Ruminococcus 2	0,0060	0,0039	0,0067	0,0078	0,0138	0,0068	5,4527	0,0655
Subdoligranulum	0,0388	0,0427	0,0435	0,0075	0,0603	0,0111	3,7429	0,1539
Ruminococcaceae uncultured	0,0022	0,0058	0,0019	0,0018	0,0016	0,0031	1,0118	0,6030
[Anaerorhabdus] furcosa group	0,0000	0,0010	0,0012	0,0008	0,0006	0,0005	2,0820	0,3531
Catenibacterium	0,0051	0,0010	0,0054	0,0082	0,0180	0,0076	6,3514	0,0418
Catenisphaera	0,0070	0,0064	0,0068	0,0044	0,0033	0,0028	1,3000	0,5220

Erysipelotrichaceae UCG-003	0,0000	0,0007	0,0000	0,0006	0,0000	0,0010	0,0111	0,9945
Erysipelotrichaceae UCG-004	0,0000	0,0012	0,0000	0,0010	0,0000	0,0006	0,0830	0,9594
Erysipelotrichaceae UCG-006	0,0000	0,0013	0,0010	0,0015	0,0014	0,0014	0,2541	0,8807
Holdemanella	0,0172	0,0127	0,0155	0,0075	0,0114	0,0070	1,0029	0,6057
Sharpea	0,0000	0,0007	0,0000	0,0007	0,0000	0,0027	0,0111	0,9945
Solobacterium	0,0129	0,0082	0,0056	0,0046	0,0072	0,0063	2,6914	0,2604
Erysipelotrichaceae uncultured	0,0141	0,0065	0,0142	0,0152	0,0047	0,0023	7,8600	0,0196
Acidaminococcus	0,0000	0,0014	0,0000	0,0007	0,0000	0,0029	0,7004	0,7045
Phascolarctobacterium	0,0046	0,0046	0,0088	0,0034	0,0106	0,0041	2,9314	0,2309
Allisonella	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	1,6706	0,4337
Anaerovibrio	0,0004	0,0020	0,0026	0,0025	0,0017	0,0047	0,6276	0,7307
Dialister	0,0000	0,0017	0,0012	0,0021	0,0027	0,0062	2,0253	0,3632
Megasphaera	0,0389	0,0291	0,0121	0,0150	0,0281	0,0237	1,9822	0,3712
Mitsuokella	0,0013	0,0018	0,0014	0,0043	0,0000	0,0047	0,0977	0,9523
Schwartzia	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,8769	0,6450
Selenomonas	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	1,8000	0,4066
Veillonellaceae uncultured	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066

Candidatus Saccharimonas	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,8000	0,4066
uncultured rumen bacterium	0,0000	0,0012	0,0000	0,0005	0,0000	0,0013	0,0111	0,9945
Desulfovibrio	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Succinivibrio	0,0000	0,0000	0,0041	0,0042	0,0014	0,0071	5,1588	0,0758
Escherichia-Shigella	0,0000	0,0010	0,0000	0,0007	0,0000	0,0009	0,4673	0,7916
Treponema 2	0,0016	0,0010	0,0021	0,0020	0,0008	0,0019	3,4793	0,1756
Mollicutes RF39 metagenome	0,0016	0,0030	0,0000	0,0013	0,0000	0,0014	1,3621	0,5061
Mollicutes RF39 uncultured bacterium	0,0012	0,0031	0,0010	0,0017	0,0000	0,0015	0,4105	0,8144
uncultured Lachnospiraceae bacterium	0,0000	0,0045	0,0010	0,0017	0,0000	0,0000	2,8869	0,2361
Mollicutes RF39 uncultured organism	0,0000	0,0007	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	1,2019	0,5483
unidentified rumen bacterium RF39	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	2,5000	0,2865
Unknown	0,0946	0,0427	0,1430	0,0397	0,0914	0,0241	3,9514	0,1387

Tabela S4 - Análise de sangue de leitões aos 50 dias de idade recebendo diferentes aditivos via ração.

Item	Aditivos				p-value
	Controle ¹	Óleos ²	Probiótico ³	SEM	
Leucócitos, mm ³	21080	17060	20020	0,485	0,5218
Neutrófilos, mm ³	13297	11740	13003	0,558	0,8490
Linfócitos, mm ³	6046 ^a	3363 ^b	5418 ^a	0,437	0,0056
Eosinófilos, mm ³	926	606	649	1,271	0,7989
Monócitos, mm ³	810	1262	948	0,755	0,2979

Tabela S5 - Análise de sangue de leitões aos 50 dias de idade recebendo diferentes aditivos via ração.

Tratamentos	Plaquetas (mil)	Eritrócitos (milhões/mm)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)
Negativo	588	7,86	11,16	41,2
Óleos funcionais	463	7,72	10,9	40,2
Probióticos	437	7,21	10,66	37,6
<i>Probabilidades</i>				
Tratamentos	0,0878	0,2979	0,2592	0,3208
CV (%)	3,45	8,79	7,64	7,61

Mínimos quadrados significa com base em 5 observações de caneta por dieta.

¹Controle: sem inclusão de aditivos zootécnicos; ²Probióticos: inclusão de 0,2% de probiótico e 0,4% de *Bacillus subtilis*. Composição do probiótico: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidiphilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccaromyces cerevisiae*; ³ óleos funcionais com a inclusão de 0,2% de Essential® em 0,2% + 0,15% de Integrity®

^{ab} As médias dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem (P < 0.05)

6 Considerações finais

O uso de compostos naturais em alternativa aos antibióticos tem mostrado resultados interessantes. No primeiro experimento, mistura e monensina foram eficazes em mitigar os desafios de coccidiose em aves.

No segundo experimento, mistura e probióticos proporcionaram semelhantemente modulação de gêneros importantes ao metabolismo e ao sistema imune do hospedeiro, como as Ruminococaceae e Prevotellaceae, porém a mistura foi mais eficaz em inibir grupos patogênicos, o que pode ter contribuído para melhor utilização de nutrientes da dieta para o desempenho animal; reduzindo o desvio de nutrientes para o sistema imune frente a disbiose e consequentemente reduzindo gastos de nutrientes com a energia na manutenção.

Em conclusão, a microbiota forma uma ecologia complexa, viva e reage a fatores externos, logo a fim de se obter melhores resultados com a utilização de compostos naturais como moduladores microbianos, deve-se fazer em conjunto com técnicas de manejo de dieta e higiênico-sanitário.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. T.; HOON, J.; MUN, H.-S.; YANG, C.-J. Evaluation of Lactobacillus and Bacillus-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. **African Journal of Microbiology Research**, 8, n. 1, p. 96-104, 2014.
- ALAGAWANY, M.; ABD EL-HACK, M.; FARAG, M.; SHAHEEN, H. *et al.* The usefulness of oregano and its derivatives in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, 74, n. 3, p. 463-474, 2018.
- ALFAIA, C.; LOPES, P.; MADEIRA, M.; PESTANA, J. *et al.* Current feeding strategies to improve pork intramuscular fat content and its nutritional quality. *In: Advances in food and nutrition research*: Elsevier, 2019. v. 89, p. 53-94.
- ANDREA, T.; ANTONIO, N.; CLAUDIO, T.; BEATRICE, P. *et al.* The impact of intestinal microbiota on bio-medical research: definitions, techniques and physiology of a “new frontier”. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, 89, n. Suppl 9, p. 52, 2018.
- ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**, 106, p. 162-170, 2017.
- APPLEGATE, T.; KLOSE, V.; STEINER, T.; GANNER, A. *et al.* Probiotics and phytogenics for poultry: Myth or reality? **Journal of Applied Poultry Research**, 19, n. 2, p. 194-210, 2010.
- AUTHORITY, E. F. S.; PREVENTION, E. C. f. D.; CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSa Journal**, 16, n. 12, p. e05500, 2018.
- BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, 535, n. 7610, p. 85-93, 2016.
- BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. **Immunity**, 46, n. 4, p. 562-576, 2017.
- BETANCOURT, L.; HUME, M.; RODRÍGUEZ, F.; NISBET, D. *et al.* Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia organoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. **Poultry science**, 98, n. 10, p. 4777-4786, 2019.
- BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, 37, n. 8, p. 852-857, 2019.
- BURDICK SANCHEZ, N. C.; CARROLL, J. A.; CORLEY, J. R.; BROADWAY, P. R. *et al.* Changes in the hematological variables in pigs supplemented with yeast cell wall in response to a Salmonella challenge in weaned pigs. **Frontiers in Veterinary Science**, 6, p. 246, 2019.

CAIRO, P. L. G.; GOIS, F. D.; SBARDELLA, M.; SILVEIRA, H. *et al.* Effects of dietary supplementation of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98, n. 2, p. 541-548, 2018.

CAMPBELL, J. M.; CRENSHAW, J. D.; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of animal science and biotechnology**, 4, n. 1, p. 1-4, 2013.

CHAPMAN, H.; JEFFERS, T.; WILLIAMS, R. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. **Poultry science**, 89, n. 9, p. 1788-1801, 2010.

CHE, L.; CHEN, H.; YU, B.; HE, J. *et al.* Long-term intake of pea fiber affects colonic barrier function, bacterial and transcriptional profile in pig model. **Nutrition and cancer**, 66, n. 3, p. 388-399, 2014.

CHEN, L.; XU, Y.; CHEN, X.; FANG, C. *et al.* The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition. **Frontiers in microbiology**, 8, p. 1688, 2017.

CHEN, Y.; WANG, J.; YU, L.; XU, T. *et al.* Microbiota and metabolome responses in the cecum and serum of broiler chickens fed with plant essential oils or virginiamycin. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

CHILDS, C. E.; CALDER, P. C.; MILES, E. A. Diet and immune function. : Multidisciplinary Digital Publishing Institute 2019.

CHRISTOFF, A. P.; SEREIA, A. F. R.; BOBERG, D.; MORAES, R. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprosecta Microbiome Technologies**, 25, 2017.

CHUNG, Y. W.; GWAK, H.-J.; MOON, S.; RHO, M. *et al.* Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses. **Plos one**, 15, n. 1, p. e0227886, 2020.

CRESPO-PIAZUELO, D.; ESTELLÉ, J.; REVILLA, M.; CRIADO-MESAS, L. *et al.* Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. **Scientific reports**, 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

DAHAN, S.; ROTH-WALTER, F.; ARNABOLDI, P.; AGARWAL, S. *et al.* Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. **Immunological reviews**, 215, n. 1, p. 243-253, 2007.

DIANGELO, J. R.; BLAND, M. L.; BAMBINA, S.; CHERRY, S. *et al.* The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, n. 49, p. 20853-20858, 2009.

DIAZ CARRASCO, J. M.; CASANOVA, N. A.; FERNÁNDEZ MIYAKAWA, M. E. Microbiota, gut health and chicken productivity: what is the connection? **Microorganisms**, 7, n. 10, p. 374,

2019.

DIAZ CARRASCO, J. M.; REDONDO, E. A.; PIN VISO, N. D.; REDONDO, L. M. *et al.* Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. **BioMed research international**, 2018, 2018.

DIBNER, J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, 11, n. 4, p. 453-463, 2002.

DOWARAH, R.; VERMA, A.; AGARWAL, N. The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. **Animal Nutrition**, 3, n. 1, p. 1-6, 2017.

DOWARAH, R.; VERMA, A.; AGARWAL, N.; PATEL, B. *et al.* Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. **Livestock Science**, 195, p. 74-79, 2017.

DRUMO, R.; PESCIAROLI, M.; RUGGERI, J.; TARANTINO, M. *et al.* Salmonella enterica serovar Typhimurium exploits inflammation to modify swine intestinal microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 5, p. 106, 2016.

DU, E.; WANG, W.; GAN, L.; LI, Z. *et al.* Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with Clostridium perfringens. **Journal of animal science and biotechnology**, 7, n. 1, p. 19, 2016.

DUSA, A. Venn: Draw venn diagrams. R package version 1.7. 2018.

ELAGAWANY, M. M. I. I. Multiple beneficial applications and modes of action of herbs in poultry health and production-A review. **Science Alert**, 11, p. 152-176, 2015.

ERICSSON, A. C.; FRANKLIN, C. L. Manipulating the gut microbiota: methods and challenges. **ILAR journal**, 56, n. 2, p. 205-217, 2015.

FENG, W.; WU, Y.; CHEN, G.; FU, S. *et al.* Sodium butyrate attenuates diarrhea in weaned piglets and promotes tight junction protein expression in colon in a GPR109A-dependent manner. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 47, n. 4, p. 1617-1629, 2018.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S. Bacteroides and prevotella. 2014.

FLINT, H. J.; SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; LOUIS, P. *et al.* Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut microbes**, 3, n. 4, p. 289-306, 2012.

FOUHSE, J.; ZIJLSTRA, R.; WILLING, B. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. **Animal Frontiers**, 6, n. 3, p. 30-36, 2016.

GADDE, U.; KIM, W.; OH, S.; LILLEHOJ, H. S. Alternatives to antibiotics for maximizing growth

performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal health research reviews**, 18, n. 1, p. 26-45, 2017.

GARAU, J.; XERCAVINS, M.; RODRÍGUEZ-CARBALLEIRA, M.; GÓMEZ-VERA, J. R. *et al.* Emergence and Dissemination of Quinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Community. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43, n. 11, p. 2736-2741, 1999.

GEHLENBORG, N. UpSetR: a more scalable alternative to Venn and Euler diagrams for visualizing intersecting sets. *In: R package version 1.4.0.*, 2016.

GEORGE, A. Antimicrobial resistance, trade, food safety and security. **One health**, 5, p. 6, 2018.

GIANNENAS, I.; PAPADOPOULOS, E.; TSALIE, E.; TRIANTAFILLOU, E. *et al.* Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. **Veterinary parasitology**, 188, n. 1-2, p. 31-40, 2012.

GIMSA, U.; TUCHSCHERER, M.; KANITZ, E. Psychosocial stress and immunity—what can we learn from pig studies? **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 12, p. 64, 2018.

GÓMEZ-GARCÍA, M.; SOL, C.; DE NOVA, P. J.; PUYALTO, M. *et al.* Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. **Porcine Health Management**, 5, n. 1, p. 1-8, 2019.

GRESSE, R.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FLEURY, M. A.; VAN DE WIELE, T. *et al.* Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. **Trends in microbiology**, 25, n. 10, p. 851-873, 2017.

GROSS, M. *Antibiotics in crisis.* : Elsevier 2013.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. d. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAN, G. G.; LEE, J.-Y.; JIN, G.-D.; PARK, J. *et al.* Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. **Scientific reports**, 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

HE, X.; HAO, D.; LIU, C.; ZHANG, X. *et al.* Effect of supplemental oregano essential oils in diets on production performance and relatively intestinal parameters of laying hens. **American Journal of Molecular Biology**, 7, n. 01, p. 73, 2017.

HEIDT, T.; SAGER, H. B.; COURTIÉS, G.; DUTTA, P. *et al.* Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. **Nature medicine**, 20, n. 7, p. 754-758, 2014.

HOU, Q.; KWOK, L.-Y.; ZHENG, Y.; WANG, L. *et al.* Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits. **Scientific reports**, 6, p. 37376, 2016.

HU, J.; WEI, Z.; WEIDNER, S.; FRIMAN, V.-P. *et al.* Probiotic *Pseudomonas* communities enhance plant growth and nutrient assimilation via diversity-mediated ecosystem functioning. **Soil Biology and Biochemistry**, 113, p. 122-129, 2017.

HU, S.; WANG, L.; JIANG, Z. Dietary additive probiotics modulation of the intestinal microbiota. **Protein and peptide letters**, 24, n. 5, p. 382-387, 2017.

HU, Y.; DUN, Y.; LI, S.; ZHANG, D. *et al.* Dietary *Enterococcus faecalis* LAB31 improves growth performance, reduces diarrhea, and increases fecal *Lactobacillus* number of weaned piglets. **PLoS One**, 10, n. 1, p. e0116635, 2015.

ISAACSON, R.; KIM, H. B. The intestinal microbiome of the pig. **Animal Health Research Reviews**, 13, n. 1, p. 100-109, 2012.

JOHANSSON, M. E.; HANSSON, G. C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. **Nature Reviews Immunology**, 16, n. 10, p. 639-649, 2016.

JOHNSON, R. Fueling the immune response: what's the cost? *In: Feed efficiency in swine*: Springer, 2012. p. 211-223.

KELLY, D.; COUTTS, A. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proceedings of the Nutrition Society**, 59, n. 2, p. 177-185, 2000.

KIARIE, E.; ROMERO, L. F.; NYACHOTI, C. M. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. **Nutrition research reviews**, 26, n. 1, p. 71-88, 2013.

KIM, C. H. Immune regulation by microbiome metabolites. **Immunology**, 154, n. 2, p. 220-229, 2018.

KIM, J.; NGUYEN, S. G.; GUEVARRA, R. B.; LEE, I. *et al.* Analysis of swine fecal microbiota at various growth stages. **Archives of microbiology**, 197, n. 6, p. 753-759, 2015.

KITESSA, S. M.; NATTRASS, G. S.; FORDER, R. E.; MCGRICE, H. A. *et al.* Mucin gene mRNA levels in broilers challenged with *Eimeria* and/or *Clostridium perfringens*. **Avian Diseases**, 58, n. 3, p. 408-414, 2014.

KOGUT, M. H. The gut microbiota and host innate immunity: regulators of host metabolism and metabolic diseases in poultry? **Journal of Applied Poultry Research**, 22, n. 3, p. 637-646, 2013.

KOGUT, M. H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. **Animal Feed Science and Technology**, 250, p. 32-40, 2019.

KONSTANTINOV, S. R.; AWATI, A. A.; WILLIAMS, B. A.; MILLER, B. G. *et al.* Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. **Environmental microbiology**, 8, n. 7, p. 1191-1199, 2006.

LALLES, J.-P.; BOSI, P.; SMIDT, H.; STOKES, C. R. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, 66, n. 2, p. 260-268, 2007.

LAN, R.; KOO, J.; KIM, I. Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbiota shedding, and fecal noxious gas emission in weaning pigs. **Animal Feed Science and Technology**, 219, p. 181-188, 2016.

LANGEMEIER, A.; MORTON, J.; SCOTTEN, S.; THAYER, M. *et al.* Effects of a Combination of Essential Oils (Victus LIV), Increased Zinc Oxide and Copper Sulfate, or Their Combination in Nursery Diets on Pig Performance. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, 3, n. 7, p. 27, 2017.

LAPÉBIE, P.; LOMBARD, V.; DRULA, E.; TERRAPON, N. *et al.* Bacteroidetes use thousands of enzyme combinations to break down glycans. **Nature communications**, 10, n. 1, p. 1-7, 2019.

LEI, Y. M. K.; NAIR, L.; ALEGRE, M.-L. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, 39, n. 1, p. 9-19, 2015.

LEKSHMI, M.; AMMINI, P.; KUMAR, S.; VARELA, M. F. The food production environment and the development of antimicrobial resistance in human pathogens of animal origin. **Microorganisms**, 5, n. 1, p. 11, 2017.

LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. *et al.* Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, 6, n. 10, p. 776-788, 2008.

LI, S.; RU, Y.; LIU, M.; XU, B. *et al.* The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. **Livestock Science**, 145, n. 1-3, p. 119-123, 2012b.

LI, Y.; FU, X.; MA, X.; GENG, S. *et al.* Intestinal microbiome-Metabolome responses to essential oils in piglets. **Frontiers in Microbiology**, 9, p. 1988, 2018.

LIU, Y. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. **Journal of animal science and biotechnology**, 6, n. 1, p. 41, 2015.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental microbiology**, 19, n. 1, p. 29-41, 2017.

LUISE, D.; BERTOCCHI, M.; MOTTA, V.; SALVARANI, C. *et al.* *Bacillus* sp. probiotic supplementation diminish the *Escherichia coli* F4ac infection in susceptible weaned pigs by influencing the intestinal immune response, intestinal microbiota and blood metabolomics.

Journal of animal science and biotechnology, 10, n. 1, p. 74, 2019.

MACH, N.; BERRI, M.; ESTELLÉ, J.; LEVENEZ, F. *et al.* Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. **Environmental microbiology reports**, 7, n. 3, p. 554-569, 2015.

MACHADO, G. S.; FONTES, D. O. Relação entre as exigências nutricionais e o sistema imune em suínos. **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE AVES E SUÍNOS**, 2, p. 293-314, 2005.

MARSIGLIO, B. N. Óleos funcionais em dieta alto grão para ovinos e efeitos sobre o desempenho, a digestibilidade dos nutrientes e características da carcaça. 2012.

MCGUCKIN, M. A.; LINDÉN, S. K.; SUTTON, P.; FLORIN, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 4, p. 265-278, 2011.

MCLAMB, B. L.; GIBSON, A. J.; OVERMAN, E. L.; STAHL, C. *et al.* Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. **PloS one**, 8, n. 4, p. e59838, 2013.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MES, T. H. Microbial diversity—insights from population genetics. **Environmental microbiology**, 10, n. 1, p. 251-264, 2008.

MILANI, C.; DURANTI, S.; BOTTACINI, F.; CASEY, E. *et al.* The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 81, n. 4, 2017.

MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. **Journal of applied microbiology**, 124, n. 6, p. 1334-1346, 2018.

MITEV, K.; TALESKI, V. Association between the gut microbiota and obesity. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, 7, n. 12, p. 2050, 2019.

MOHITI-ASLI, M.; GHANAATPARAST-RASHTI, M. Comparison of the effect of two phytochemical compounds on growth performance and immune response of broilers. **Journal of Applied Animal Research**, 45, n. 1, p. 603-608, 2017.

MORAES, P.; ANDRETTA, I.; CARDINAL, K.; CERON, M. *et al.* Effect of functional oils on the immune response of broilers challenged with *Eimeria* spp. **animal**, 13, n. 10, p. 2190-2198, 2019b.

MORAES, P.; CARDINAL, K.; GOUVÊA, F.; SCHROEDER, B. *et al.* Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. **Poultry science**, 98, n. 11, p. 5456-5464, 2019a.

MORAES, P.; CARDINAL, K.; GOUVÊA, F.; SCHROEDER, B. *et al.* Comparison between a commercial blend of functional oils and monensin on the performance and microbiota of coccidiosis-challenged broilers. **Poultry science**, 98, n. 11, p. 5456-5464, 2019b.

MORAES, P. d. O. Efeito da mistura do líquido da casca da castanha de caju e do óleo de mamona no desempenho, na imunidade e na microbiota de frangos de corte desafiados por coccidiose. 2017.

MURAKAMI, A.; EYNG, C.; TORRENT, J. Effects of functional oils on coccidiosis and apparent metabolizable energy in broiler chickens. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 27, n. 7, p. 981, 2014.

MURUGESAN, S.; ULLOA-MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ-ROJANO, H.; GALVÁN-RODRÍGUEZ, F. *et al.* Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 34, n. 7, p. 1337-1346, 2015.

MUZAFFAR, S.; CHATTOO, B. B. Apoptosis-inducing factor (Aif1) mediates anacardic acid-induced apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis**, 22, n. 3, p. 463-474, 2017.

NIU, Q.; LI, P.; HAO, S.; ZHANG, Y. *et al.* Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. **Scientific reports**, 5, p. 9938, 2015.

NOROUZI, B.; QOTBI, A. A. A.; SEIDAVI, A.; SCHIAVONE, A. *et al.* Effect of different dietary levels of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and yarrow (*Achillea millefolium*) on the growth performance, carcass traits and ileal micro-biota of broilers. **Italian Journal of Animal Science**, 14, n. 3, p. 3930, 2015.

OAKLEY, B. B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W. K. *et al.* The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS microbiology letters**, 360, n. 2, p. 100-112, 2014.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P. *et al.* Community ecology package. **R package version**, p. 2.0-2, 2011.

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. **Inflammation and regeneration**, 38, n. 1, p. 1-8, 2018.

OMONIJO, F. A.; NI, L.; GONG, J.; WANG, Q. *et al.* Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, 4, n. 2, p. 126-136, 2018.

ORGANIZATION, W. H. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. World Health Organization. 2017.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. d. C. Sistema digestório: integração básico-clínica. **São Paulo: Blucher**,

2016.

OUWERKERK, J. P.; DE VOS, W. M.; BELZER, C. Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, 27, n. 1, p. 25-38, 2013.

PAJARILLO, E. A. B.; CHAE, J.-P.; BALOLONG, M. P.; KIM, H. B. *et al.* Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. **The Journal of general and applied microbiology**, 60, n. 4, p. 140-146, 2014.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut microbes**, 5, n. 1, p. 108-119, 2014.

PAN, L.; ZHAO, P.; MA, X.; SHANG, Q. *et al.* Probiotic supplementation protects weaned pigs against enterotoxigenic Escherichia coli K88 challenge and improves performance similar to antibiotics. **Journal of animal science**, 95, n. 6, p. 2627-2639, 2017.

PAUL, S.; DEY, A. Nutrition in health and immune function of ruminants. **Indian Journal of Animal Sciences**, 85, n. 2, p. 103-112, 2015.

PEI, R. s.; ZHOU, F.; JI, B. p.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. **Journal of food science**, 74, n. 7, p. M379-M383, 2009.

PENG, X.; WANG, R.; HU, L.; ZHOU, Q. *et al.* Enterococcus faecium NCIMB 10415 administration improves the intestinal health and immunity in neonatal piglets infected by enterotoxigenic Escherichia coli K88. **Journal of animal science and biotechnology**, 10, n. 1, p. 72, 2019.

PERRI, A. M.; O'SULLIVAN, T. L.; HARDING, J. C.; WOOD, R. D. *et al.* Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. **The Canadian Veterinary Journal**, 58, n. 4, p. 371, 2017.

PERRY, M. Flexible Heatmaps for Functional Genomics and Sequence Feature S. **R Package Version 1.0.0**, 2019.

PIRES, S. M.; DE KNEGT, L.; HALD, T. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union. **EFSA Supporting Publications**, 8, n. 8, p. 184E, 2011.

POTT, J.; HORNEF, M. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. **EMBO reports**, 13, n. 8, p. 684-698, 2012.

QING, X.; ZENG, D.; WANG, H.; NI, X. *et al.* Preventing subclinical necrotic enteritis through Lactobacillus johnsonii BS15 by ameliorating lipid metabolism and intestinal microflora in broiler chickens. **Amb Express**, 7, n. 1, p. 139, 2017.

RAGUPATHI, N. D.; SETHUVEL, D. M.; INBANATHAN, F.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. **New microbes and new infections**, 21, p. 58-62, 2018.

RI, C.-S.; JIANG, X.-R.; KIM, M.-H.; WANG, J. *et al.* Effects of dietary oregano powder supplementation on the growth performance, antioxidant status and meat quality of broiler chicks. **Italian Journal of Animal Science**, 16, n. 2, p. 246-252, 2017.

RIOS, J.-L. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. *In: Essential oils in food preservation, flavor and Safety*: Elsevier, 2016. p. 3-10.

RIZZATTI, G.; LOPETUSO, L.; GIBIINO, G.; BINDA, C. *et al.* Proteobacteria: a common factor in human diseases. **BioMed research international**, 2017, 2017.

RONQUILLO, M. G.; HERNANDEZ, J. C. A. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. **Food Control**, 72, p. 255-267, 2017.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Universidade Federal de Viçosa p. 488p. 2017.

SAHU, A.; NAYAK, N.; SAHU, R.; SAHOO, J. *et al.* Application of Metagenomics in Livestock Improvement. **International Journal of Livestock Research**, 7, p. 30-38, 2017.

SALAHEEN, S.; KIM, S.-W.; HALEY, B. J.; VAN KESSEL, J. A. S. *et al.* Alternative growth promoters modulate broiler gut microbiome and enhance body weight gain. **Frontiers in microbiology**, 8, p. 2088, 2017.

SALAK-JOHNSON, J. L.; WEBB, S. R. Pig social status and chronic cold or crowd stressors differentially impacted immune response. **Open Journal of Animal Sciences**, 8, n. 03, p. 280, 2018.

SCHMIDL, M. K.; LABUZA, T. P. **Essentials of functional foods**. Springer Science & Business Media, 2000. 0834212617.

SHERIDAN, P. O.; MARTIN, J. C.; LAWLEY, T. D.; BROWNE, H. P. *et al.* Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. **Microbial Genomics**, 2, n. 2, 2016.

SIMITZIS, P. E. Enrichment of animal diets with essential oils—a great perspective on improving animal performance and quality characteristics of the derived products. **Medicines**, 4, n. 2, p. 35, 2017.

SMITH, B. J.; MILLER, R. A.; ERICSSON, A. C.; HARRISON, D. C. *et al.* Changes in the gut microbiota and fermentation products associated with enhanced longevity in acarbose-treated mice. **BioRxiv**, p. 311456, 2018.

SOUSA, V. R. d. **Extração e caracterização de óleo de sementes de frutos**. 2012. -.

STANLEY, D.; HUGHES, R. J.; MOORE, R. J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, n. 10, p. 4301-4310, 2014.

STANLEY, D.; WU, S.-B.; RODGERS, N.; SWICK, R. A. *et al.* Differential responses of cecal microbiota to fishmeal, Eimeria and Clostridium perfringens in a necrotic enteritis challenge model in chickens. **PLoS one**, 9, n. 8, p. e104739, 2014.

SU, G.; ZHOU, X.; WANG, Y.; CHEN, D. *et al.* Effects of plant essential oil supplementation on growth performance, immune function and antioxidant activities in weaned pigs. **Lipids in health and disease**, 17, n. 1, p. 139, 2018.

SUN, J.; DU, L.; LI, X.; ZHONG, H. *et al.* Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets. **Scientific reports**, 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

TANG, K. L.; CAFFREY, N. P.; NÓBREGA, D. B.; CORK, S. C. *et al.* Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, 1, n. 8, p. e316-e327, 2017.

TIAN, Q.; PIAO, X. Essential Oil Blend Could Decrease Diarrhea Prevalence by Improving Antioxidative Capability for Weaned Pigs. **Animals**, 9, n. 10, p. 847, 2019.

TIAN, Z.; LIU, X.; DAI, R.; XIAO, Y. *et al.* Enterococcus faecium HDRsEf1 protects the intestinal epithelium and attenuates ETEC-induced IL-8 secretion in enterocytes. **Mediators of inflammation**, 2016, 2016.

TIMBERMONT, L.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, 40, n. 4, p. 341-347, 2011.

UPADHAYA, S. D.; KIM, I. H. Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals—a review. **Annals of Animal Science**, 17, n. 4, p. 929-948, 2017.

UPADHAYA, S. D.; KIM, S. J.; KIM, I. H. Effects of gel-based phytogenic feed supplement on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and intestinal morphology in weanling pigs. **Journal of Applied Animal Research**, 44, n. 1, p. 384-389, 2016b.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VERDENELLI, M. C.; GHELFI, F.; SILVI, S.; ORPIANESI, C. *et al.* Probiotic properties of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei isolated from human faeces. **European**

Journal of Nutrition, 48, n. 6, p. 355-363, 2009.

VIEIRA, A. M.; SORATTO, T. A. T.; CARDINAL, K. M.; WAGNER, G. *et al.* Modulation of the intestinal microbiota of broilers supplemented with monensin or functional oils in response to challenge by *Eimeria* spp. **PloS one**, 15, n. 8, p. e0237118, 2020.

VOHRA, A.; SYAL, P.; MADAN, A. Probiotic yeasts in livestock sector. **Animal Feed Science and Technology**, 219, p. 31-47, 2016.

WANG, J.; HAN, Y.; MENG, F.; ZHAO, J. *et al.* Fecal microbiota succession of piglets from birth to post-weaning by 454 pyrosequencing analysis. **Transactions of Tianjin University**, 23, n. 3, p. 211-220, 2017.

WANG, L.; LILBURN, M.; YU, Z. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. **Frontiers in microbiology**, 7, p. 593, 2016.

WHITEHEAD, R.; YOUNG, G.; BHATHAL, P. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). **Gut**, 27, n. 12, p. 1457-1463, 1986.

WICKHAM, H. Reshaping data with the reshape package. **Journal of statistical software**, 21, n. 12, p. 1-20, 2007.

WICKHAM, H. The split-apply-combine strategy for data analysis. **Journal of Statistical Software**, 40, n. 1, p. 1-29, 2011.

XU, H.; WEI, Y.; MA, H.; LIU, Y. *et al.* Alterations of Gut Microbiome in the Patients With Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome. **Frontiers in microbiology**, 9, p. 2315, 2018.

YANG, C.; CAO, G.; FERKET, P.; LIU, T. *et al.* Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. **Poultry science**, 91, n. 9, p. 2121-2129, 2012.

YANG, C.; ZHANG, L.; CAO, G.; FENG, J. *et al.* Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, 97, n. 1, p. 133-143, 2019.

YANG, H.; HUANG, X.; FANG, S.; HE, M. *et al.* Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. **Frontiers in microbiology**, 8, p. 1555, 2017.

YANG, M.; COOK, M. E. Dietary Conjugated Linoleic Acid Decreased Cachexia, Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production, and Modifies Splenocyte Cytokines Production. **Experimental Biology and Medicine**, 228, n. 1, p. 51-58, 2003.

YARON, J. R.; AMBADAPADI, S.; ZHANG, L.; CHAVAN, R. N. *et al.* Immune protection is

dependent on the gut microbiome in a lethal mouse gammaherpesviral infection. **Scientific reports**, 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

YI, H.; ZHANG, L.; GAN, Z.; XIONG, H. *et al.* High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine. **Scientific reports**, 6, p. 25679, 2016.

ZE, X.; LE MOUGEN, F.; DUNCAN, S. H.; LOUIS, P. *et al.* Some are more equal than others: the role of “keystone” species in the degradation of recalcitrant substrates. **Gut Microbes**, 4, n. 3, p. 236-240, 2013.

ZENG, Z.; XU, X.; ZHANG, Q.; LI, P. *et al.* Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, 86, n. 3, p. 279-285, 2015.

ZHAI, H.; LIU, H.; WANG, S.; WU, J. *et al.* Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, 4, n. 2, p. 179-186, 2018.

ZHANG, L.; WU, W.; LEE, Y.-K.; XIE, J. *et al.* Spatial heterogeneity and co-occurrence of mucosal and luminal microbiome across swine intestinal tract. **Frontiers in microbiology**, 9, p. 48, 2018.

ZHANG, Z.; ROLANDO, A.; KIM, I. Effects of benzoic acid, essential oils and *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbiota and faecal noxious gas emission in weanling pigs. **Journal of applied animal research**, 44, n. 1, p. 173-179, 2016.

ZHAO, W.; WANG, Y.; LIU, S.; HUANG, J. *et al.* The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. **PloS one**, 10, n. 2, p. e0117441, 2015.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, p. 1-15, 2020.

ZHONG, X.; ZHANG, Z.; WANG, S.; CAO, L. *et al.* Microbial-driven butyrate regulates jejunal homeostasis in piglets during the weaning stage. **Frontiers in microbiology**, 9, p. 3335, 2019.

ZHOU, Z.; NIE, K.; HUANG, Q.; LI, K. *et al.* Changes of cecal microflora in chickens following *Eimeria tenella* challenge and regulating effect of coated sodium butyrate. **Experimental Parasitology**, 177, p. 73-81, 2017.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; CRUMP, L.; WHITTAKER, M. *et al.* **One Health: the theory and practice of integrated health approaches**. CABI, 2020. 1789242576.