

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA - PPZ

PROTÓCOLOS PARA INDUÇÃO DE ARTRITE EM LEITÕES
NA FASE DE ALEITAMENTO E AVALIAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE LARANJA MICROENCAPSULADO APÓS O
DESMAME

Autor: Leonardo Filipe Malavazi Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Pozza

MARINGÁ
Estado do Paraná
Outubro - 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA - PPZ

PROTÓCOLOS PARA INDUÇÃO DE ARTRITE EM LEITÕES
NA FASE DE ALEITAMENTO E AVALIAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE LARANJA MICROENCAPSULADO APÓS O
DESMAME

Autor: Leonardo Filipe Malavazi Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Pozza

“Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal”

MARINGÁ

Estado do Paraná

Outubro - 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

F383p

Ferreira, Leonardo Filipe Malavazi

Protocolos para indução de artrite em leitões na fase de aleitamento e avaliação do óleo essencial de laranja microencapsulado após o desmame / Leonardo Filipe Malavazi Ferreira. -- Maringá, PR, 2021.
109 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Pozza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. Artrite em leitões - Protocolo para indução. 2. Aditivos alimentares. 3. Óleo essencial. 4. Limoneno. 5. Mitigação da artrite. I. Castilha, Leandro Dalcin, orient. II. Pozza, Paulo Cezar, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.4

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065



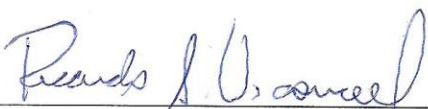
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROTÓCOLOS PARA INDUÇÃO DE ARTRITE EM LEITÕES
NA FASE DE ALEITAMENTO E AVALIAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE LARANJA MICROENCAPSULADO APÓS O
DESMAME

Autor: Leonardo Filipe Malavazi Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADO em 23 de outubro de 2020.



Prof. Dr. Ricardo Souza
Vasconcellos



Prof. Dr. Tiago Junior Pasquetti



Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha
Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai, Sr. Elio Donizete Ferreira, à minha mãe, Sra. Helenice Malavazi Ferreira, à minha irmã, Janaína de Fátima Malavazi Ferreira, e à minha namorada, Heloísa Maria Campaner Dias, que sempre me apoiaram e me incentivaram dando forças para continuar e conquistar os meus objetivos. Amo muito vocês, obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento a Deus que sempre se fez presente em minha jornada, trazendo pessoas em meu caminho que foram essenciais para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida. À minha família e namorada que não mediram esforços para me ajudar a concluir este trabalho!

À Universidade Estadual de Maringá, por possibilitar meu desenvolvimento pessoal e profissional durante anos de estudo, concluindo o Curso de Zootecnia e a Pós-graduação; ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ-UEM) pela grandiosa oportunidade de realização deste trabalho, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha, e ao meu coorientador, Paulo Cesar Pozza, por todos os ensinamentos, toda dedicação, conselhos, apoio, paciência e companheirismo durante esse período.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Isabela Ferreira Leal e Maria Paula Campos, pois sem a ajuda e apoio de vocês não seria capaz de desenvolver e concluir este trabalho.

Aos amigos de turma com quem compartilhei algumas horas de estudo e troca de experiências durante esse período.

A todos os meus amigos da vida que acompanharam toda minha trajetória, dedico o meu muito obrigado.

A todos os profissionais da UEM que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho. Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial aos do setor de suínos.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

Leonardo Filipe Malavazi Ferreira, nasceu no dia 17 de Julho de 1994 na cidade de Apucarana, Paraná, Brasil, filho de Elio Donizete Ferreira e Helenice Malavazi Ferreira.

Em Fevereiro de 2013, ingressou no Curso de graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, e concluiu em Dezembro de 2017, obtendo o diploma de Zootecnista em Fevereiro de 2018.

Em março de 2018, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal – Nutrição de monogástricos, na Universidade Estadual de Maringá. Em outubro de 2020, defendeu sua dissertação de mestrado.

ÍNDICE

Página

LISTA DE TABELAS	vi
ARTIGO 1: Protocolos para indução de artrite em leitões lactentes e seus efeitos sobre as variáveis morfológicas, estado oxidativo e resposta inflamatória após o desmame	vi
ARTIGO 2: O óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado mitiga os efeitos do estresse oxidativo em leitões desmamados submetidos à artrite induzida na fase de aleitamento	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ARTIGO 1: Protocolos para indução de artrite em leitões lactentes e seus efeitos sobre as variáveis morfológicas, estado oxidativo e resposta inflamatória após o desmame	viii
ARTIGO 2: O óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado mitiga os efeitos do estresse oxidativo em leitões desmamados submetidos à artrite induzida na fase de aleitamento	ix
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	1
III. OBJETIVOS	17
ARTIGO 1	18
Protocolos para indução de artrite em leitões lactentes e seus efeitos sobre as variáveis morfológicas, estado oxidativo e resposta inflamatória após o desmame	18
Highlights	19
1. Introdução	20
2. Material e métodos	21
3. Resultados	27
5. Conclusão	48
ARTIGO 2	53
O óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado mitiga os efeitos do estresse oxidativo em leitões desmamados submetidos à artrite induzida na fase de aleitamento	53
Highlights	54
1. Introdução	54
2. Material e métodos	56
3. Resultados	68
4. Discussão	77
5. Conclusão	81
Referências	82

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: Protocolos para indução de artrite em leitões lactentes e seus efeitos sobre as variáveis morfológicas, estado oxidativo e resposta inflamatória após o desmame

Tabela 1. Composição centesimal, química e energética das rações pré-iniciais I e II.	22
Tabela 2. Peso vivo, temperatura superficial e parâmetros morfológicos da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas recém desmamadas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação.....	28
Tabela 3. Variáveis de estado oxidativo no plasma de fêmeas suínas recém desmamadas, com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução.....	34
Tabela 4. Peso relativo e variáveis de estado oxidativo no fígado de fêmeas suínas recém desmamadas, com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução.....	36
Tabela 5. Concentração de proteínas totais, albumina, globulinas e perfil de proteínas de fase aguda no soro de fêmeas suínas recém desmamadas, com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução.....	37
Tabela 6. Infiltração de leucócitos no líquido sinovial de fêmeas suínas recém desmamadas, com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução.....	40

ARTIGO 2: O óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado mitiga os efeitos do estresse oxidativo em leitões desmamados submetidos à artrite induzida na fase de aleitamento

Tabela 1. Composição centesimal, química e energética das rações experimentais para leitões dos 7,0 aos 11,0 kg com ou sem antibiótico ou limoneno.....	56
Tabela 2. Concentração de produtos empregados na microencapsulação do D-Limoneno 99%.....	59
Tabela 3. Características físico-químicas e atividade antioxidante do D-Limoneno-99% e do microencapsulado contendo 5% de Limoneno.....	60
Tabela 4. Composição centesimal, química e energética da ração pré-inicial I.....	62
Tabela 5. Variáveis de desempenho de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.....	67
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.....	68
Tabela 7. Contagem leucocitária e hematócrito de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.....	69
Tabela 8. Parâmetros oxidativos plasmáticos de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.....	70
Tabela 9. Desdobramento da interação para capacidade antioxidante total (ABTS) no plasma de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.....	71

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Diferença entre a membrana de células Gram-positivas e Gram-negativas que influencia no mecanismo de ação dos óleos essenciais (A). Principais efeitos do uso de óleos essenciais em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho para suínos na fase de creche, crescimento e terminação (B). Fonte: Adaptado de Barreto (2019)..... 08

Figura 2. Estrutura do limoneno (1-metil-4- (1-metiletenil)) (Murali et al., 2012)..... 10

ARTIGO 1: Protocolos para indução de artrite em leitões lactentes e seus efeitos sobre as variáveis morfológicas, estado oxidativo e resposta inflamatória após o desmame

Figura 1. Peso vivo (kg) de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação em diferentes grupos e protocolos de indução (A) ou em diferentes dias de avaliação pós-desmame (B)..... 29

Figura 2. Temperatura superficial (°C) da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação em diferentes grupos e protocolos de indução (A) ou em diferentes dias de avaliação pós-desmame (B)..... 30

Figura 3. Perímetro (cm/kg) da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação em diferentes grupos e protocolos de indução (A) ou em diferentes dias de avaliação pós-desmame (B)..... 31

Figura 4. Diâmetro (cm/kg) da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação em diferentes grupos e protocolos de indução (A) ou em diferentes dias de avaliação pós-desmame (B)..... 32

Figura 5. Volume (mL/kg) da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação em diferentes grupos e protocolos de indução (A) ou em diferentes dias de avaliação pós-desmame (B)..... 33

Figura 6. Imagens termográficas dos membros posteriores de uma fêmea suína recém desmamada (21 dias de idade) do grupo positivo (A) e de outra do grupo controle (B). 34

Figura 7. Glutathiona reduzida – GSH (A), Capacidade antioxidante total – TAC (B), Tióis (C) e Proteínas carboniladas (D) no plasma de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação em diferentes grupos e protocolos de indução..... 35

Figura 8. Peso relativo de fígado (A), Catalase (B), Superóxido dismutase (C) e Proteínas carboniladas (D) no tecido hepático de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução..... 36

Figura 9. Proteínas totais (A), Albumina (B), Globulinas (C) e relação Albumina:Globulinas (D) no soro de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução..... 38

Figura 10. Imunoglobulina A – IgA (A), Imunoglobulina G – IgG (B), Transferrina (C), Ceruloplasmina (D), Haptoglobina (E) e α 1-glicoproteína ácida (F) no soro de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução..... 39

Figura 11. Leucograma do líquido sinovial de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução..... 41

ARTIGO 2: O óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado mitiga os efeitos do estresse oxidativo em leitões desmamados submetidos à artrite induzida na fase de aleitamento

Figura 1. Peso vivo (kg) de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame..... 71

Figura 2. Temperatura superficial (°C) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame..... 72

Figura 3. Perímetro (cm/kg) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame..... 73

Figura 4. Diâmetro (cm/kg) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame..... 74

Figura 5. Volume (mL/kg) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame..... 75

RESUMO

Artrites são inflamações articulares que geram atraso no desenvolvimento de leitões, perda de peso, resposta inflamatória e estresse oxidativo. Considerando a necessidade de padronização de um método para indução de artrite em leitões, para uso em pesquisas que busquem mitigar seus efeitos, o presente estudo foi realizado com objetivo de determinar uma metodologia de indução de artrite na fase de lactação e posterior utilização dietética de óleo de laranja microencapsulado em substituição total ou parcial a antibiótico, por ser um produto com alto teor de polifenóis e flavonoides, com potencial de mitigar os efeitos secundários da inflamação articular, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Experimento I: Foram utilizadas 48 fêmeas suínas mestiças (Topigs x AGPIC 425), com idade inicial de 7 dias e peso médio inicial de $1,76 \pm 0,28$ kg. Metade desses animais (n=24) foi submetida à indução de artrite, na articulação tarso-falange do membro posterior direito, através de injeção intradérmica de adjuvante completo de FREUND (*Mycobacterium tuberculosis* derivadas de cepa humana H37Rv e inativadas pelo calor, suspensas em óleo mineral 0,5% (w/v)). Foram testados os protocolos de aplicação I (7 dias de idade - 0,1 mL de adjuvante), II (7 e 14 dias de idade - 0,2 mL de adjuvante), III (14 e 21 dias de idade - 0,2 mL de adjuvante) e IV (7, 14 e 21 dias de idade - 0,3 mL de adjuvante). A outra metade dos animais (n=24) foi submetida ao mesmo manejo, porém com aplicações de soro fisiológico (0,9%). Todos os animais foram desmamados aos 21 dias de idade e alojados individualmente em baias de creche por 15 dias, para as avaliações pós-desmame. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro protocolos de indução do grupo positivo (adjuvante) e quatro do controle (soro fisiológico), com 6 repetições por tratamento e um animal por unidade experimental. As avaliações de peso vivo, temperatura superficial e morfologia articular foram realizadas no dia do desmame (dia 0), aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias pós desmame. No último dia, foram realizadas as coletas de sangue para determinação plasmática de GSH, TAC, tióis e proteínas carboniladas, e dosagem sérica das proteínas de fase aguda, além de coleta de fígado para determinação da catalase, SOD e proteínas carboniladas, e de líquido sinovial para a contagem de leucócitos. Todos os protocolos de indução resultam na manifestação da doença na fase pós-desmame. A aplicação de adjuvante aos 7 dias é o protocolo indicado, devido à viabilidade técnica, pois os animais são mais leves, de fácil contenção e utiliza-se apenas uma dose de adjuvante. Experimento II: Foram utilizadas 64 fêmeas suínas com peso médio inicial de $5,67 \pm 0,18$ kg, desmamadas aos 21 dias. Os

animais foram distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 X 4, cujos tratamentos consistiram na indução de artrite por adjuvante ou não e 4 rações experimentais. Foram utilizadas 8 repetições por tratamento e um animal por unidade experimental. Os tratamentos avaliados foram: controle negativo (ração sem adição de antibiótico ou limoneno), controle positivo (ração com antibiótico: 300 ppm de lincomicina 44%), limoneno (ração com limoneno: 500 ppm de D-limoneno 12,38%) e limoneno + antibiótico (ração com limoneno: 250 ppm de D-limoneno 12,38% + antibiótico: 150 ppm de lincomicina 44%). Foram mensuradas variáveis de desempenho, parâmetros morfológicos, bioquímicos, hematológicos e de estado oxidativo no sangue dos leitões recém-desmamados. A indução de artrite por adjuvante na lactação resulta em queda de peso vivo ao desmame, piora no desempenho, estresse inflamatório e oxidativo, elevação de temperatura superficial e das variáveis morfológicas da articulação. O uso de Limoneno microencapsulado (500 ppm de D-limoneno 12,38%) ou de Limoneno microencapsulado + Antibiótico (250 ppm de D-limoneno 12,38% + 150 ppm de lincomicina 44%) mitigam os efeitos do estresse oxidativo em animais na fase pós-desmame gerados pela artrite induzida na fase de lactação.

Palavras-chave: Coproduto da laranja, Inflamações em suínos, Limoneno.

ABSTRACT

Arthritis is joint inflammation that causes piglet development delay, weight loss, inflammatory response and oxidative stress. Need for standardization of a method to induce arthritis in piglets, for use in research that seeks to mitigate its effects, the present study was carried out with the objective of determining an arthritis induction methodology in the lactation phase and subsequent dietary use of orange oil microencapsulated to replace antibiotics, as it is a product with a high content of polyphenols and flavonoids, with the potential to mitigate the effects of joint inflammation, due to its antimicrobial and antioxidant properties. Experiment I: 48 crossbred gilts (Topigs x AGPIC 425) were used, with an initial age of 7 days and an average initial weight of 1.76 ± 0.28 kg. Half of these animals ($n = 24$) were submitted to arthritis induction, in the tarsophalange joint of the right posterior limb, through intradermal injection of complete FREUND adjuvant (*Mycobacterium tuberculosis* derived from human H37Rv strain and inactivated by heat, suspended in oil mineral 0.5% (w / v)). Application protocols I (7 days old - 0.1 ml of adjuvant), II (7 and 14 days of age - 0.2 ml of adjuvant), III (14 and 21 days of age - 0.2 mL of adjuvant) and IV (7, 14 and 21 days of age - 0.3 mL of adjuvant). The other half of the animals ($n = 24$) were submitted to the same management, but with saline applications (0.9%). All animals were weaned at 21 days of age and housed individually in a swine nursery for 15 days, for post-weaning assessments. The experimental design was in randomized blocks, with four protocols for induction of the positive group (adjuvant) and four of the control (saline), with 6 replicates per treatment and one animal per experimental unit. Assessments of live weight, surface temperature and joint morphology were performed on the day of weaning (day 0), at 3, 6, 9, 12 and 15 days after weaning. On the last day, blood samples were taken for plasma determination of GSH, TAC, thiols and carbonylated proteins, and serum measurement of acute phase proteins, in addition to liver collection for the determination of catalase, SOD and carbonylated proteins and synovial fluid for leukocyte count. All arthritis induction protocols for piglets in the lactation phase result in the manifestation of the disease in the post-weaning phase. The application of adjuvant at 7 days is the indicated protocol, due to the technical feasibility, as the animals are lighter, easy to contain and only one dose of adjuvant is used. Experiment II: 64 gilts with an average initial weight of 5.67 ± 0.18 kg were used, weaned at 21 days. The animals were distributed in a randomized block design, in a 2 X 4 factorial scheme, whose treatments consisted of

inducing arthritis by adjuvant or not and 4 experimental diets. Eight replicates per treatment and one animal per experimental unit were used. The evaluated treatments were: negative control (ration without addition of antibiotic or limonene), positive control (ration with antibiotic: 300 ppm of lincomycin 44%), limonene (ration with limonene: 500 ppm of D-limonene 12.38%) and limonene + antibiotic (diet with limonene: 250 ppm of D-limonene 12.38% + antibiotic: 150 ppm of lincomycin 44%). Performance variables, morphological, biochemical, hematological parameters and oxidative status were measured in the blood of newly weaned piglets. The induction of arthritis by adjuvant in lactation results in a drop in live weight at weaning, worsening in performance, inflammatory and oxidative stress, elevation of surface temperature and joint morphological variables. The use of microencapsulated Limonene (500 ppm D-limonene 12.38%) or microencapsulated Limonene + Antibiotic (250 ppm D-limonene 12.38% + 150 ppm lincomycin 44%) mitigate the effects of oxidative stress in animals in the post-weaning phase generated by arthritis induced in the lactation phase.

Keywords: Orange by-products, Inflammation in swine, Limonene.

I. INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne suína, em 2017, foi de 110,961 milhões de toneladas. O Brasil é o 4º maior produtor mundial e o 4º maior do ranking em exportação de carne suína, com uma produção de 3.759 milhões de toneladas (3% do total da produção mundial), ficando atrás da União Europeia, Estados Unidos e Canadá (ABPA, 2018). No Brasil, o consumo de carne suína *per capita*/ano é de 14,7 quilos, sendo o país o sexto maior consumidor, fazendo da suinocultura uma atividade muito importante e de crescimento constante (Antunes, 2018).

Para atender à demanda cada vez mais crescente, a produção racional de suínos, nos últimos anos, vem sendo desenvolvida em sistema intensivo, baseada em confinamento total em todas as fases de produção. Isso tem gerado uma densidade populacional cada vez maior, o que tem potencializado maiores desafios sanitários, especialmente em granjas em que as práticas de higienização não são eficientes. Isso tem propiciado o desenvolvimento de enfermidades diversas, dentre as quais as artrites vêm apresentando grande importância (Dias et al., 2014).

As artrites são inflamações articulares causadas principalmente por infecção bacteriana decorrente de manejo sanitário ou profilático inadequados, que acometem principalmente os leitões, causando atraso no crescimento, descarte precoce, formação de animais refugos, óbitos ou condenação de carcaças nos abatedouros (Hill, 1992; Morés et al., 2000; Alberton et al., 2003).

Por se tratar de um processo inflamatório, a artrite resulta em alterações metabólicas que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e outras espécies reativas. Essas ERO naturalmente fazem parte do metabolismo dos animais como consequência do metabolismo do oxigênio molecular (O_2) e têm como função, em condições normais, eliminar agentes agressores. Caso ocorra estresse oxidativo, o organismo reage com o sistema antioxidante, a fim de restabelecer o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. O sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático e não enzimático. As principais enzimas antioxidantes são o complexo da glutatona peroxidase (GSH-Px), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (Ferreira e Matsubara, 1997; Vasconcelos et al., 2007).

Neste sentido, produtos com alto teor de polifenóis e flavonoides despertam interesse devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, com enorme potencial de prevenção ou mitigação de artrites em suínos. As principais fontes de

compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, ou seus resíduos industriais, após a extração do suco (Davis, 2004).

Óleos essenciais são exemplos de aditivos alimentares que podem aprimorar a defesa imunológica dos suínos durante situações críticas, elevando a defesa antioxidante não enzimática e auxiliando no *status* sanitário do organismo (Franz et al., 2010). Tartrakoon et al. (2009) avaliaram a inclusão deste óleo cítrico, somada a outros (cravo e menta), de 0,5% deste blend (5mL/kg) na dieta de leitões recém-desmamados e observaram melhora na resposta imune e no desempenho dos animais.

Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar diferentes protocolos de indução de artrite por adjuvante em leitões na fase de lactação e seus efeitos na fase pós desmame, além de avaliar o óleo essencial de laranja sobre o desempenho, parâmetros bioquímicos, hematológicos e de estado oxidativo no sangue dos leitões com ou sem artrite induzida.

II. REVISÃO DE LITERATURA

ESTRESSE NO DESMAME DE LEITÕES

O desmame é um dos períodos mais estressantes para os suínos e que inicia a fase de creche, quando é realizada a separação dos animais de suas mães, a mistura com animais desconhecidos, a mudança da alimentação líquida para a sólida e a alteração do ambiente (Andrade et al., 2015). Estes fatores, associados à imaturidade fisiológica e imunológica dos leitões, tornam o ambiente gastrointestinal propício à proliferação de microrganismos patogênicos, podendo aumentar as desordens entéricas como ocorrência de diarreias, menor digestão e absorção de nutrientes dietéticos e, conseqüentemente, piora no desempenho (Pluske et al., 2003; Gomez, et al., 2015).

A incapacidade de lidar com todos os desafios do desmame pode resultar em danos ao sistema imunológico, com conseqüências que vão desde problemas intestinais (diarreias) até infecções oportunistas, inapetência, cacexia e óbito de leitões, que costumam ocorrer imediatamente após o período de desmame (Campbell et al., 2013; Montagne et al., 2003).

Quando se trata de desafios, as instalações e os manejos da produção são fatores importantes a se considerar pois casos como condições e tipo de piso da instalação e de comedouros, aliados a frequência de limpeza e cuidados em geral, podem ser a causa de possíveis quadros de infecção nos animais, reduzindo seu potencial imunológico. São questões multifatoriais que vão desde a secagem do leitão recém-nascido até manejos mais invasivos, por exemplo o corte de umbigo, a castração, o corte de dentes e da cauda (Jayaraman e Nyachoti, 2017).

As infecções são oportunistas e afetam os animais mais susceptíveis. A realização do manejo inadequado ou uso de instalação imprópria, podem causar feridas nos animais e prejudicar o seu desenvolvimento. Como exemplos, as mordidas constantes na cauda ou as feridas corporais dos animais podem ocorrer em casos de manejo inadequado ou uso de instalação imprópria, favorecendo a contaminação e proliferação de bactérias patogênicas (Jayaraman e Nyachoti, 2017; Veit et al., 2017).

ARTRITES E OUTRAS INFLAMAÇÕES

As artrites são inflamações articulares que podem acometer os suínos em qualquer faixa etária, causando perdas econômicas por atraso no crescimento, descarte precoce de

reprodutores, gastos com medicamentos, mão de obra, formação de animais refugos, óbitos ou condenação de carcaças nos abatedouros.

As principais causas de artrite nos suínos jovens são a infecção por *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, entre outros agentes (Jonhston et al., 1987; Friede & Segall, 1996). As áreas afetadas apresentam-se inflamadas, com febre local, articulações inchadas, com presença de exsudato, que pode ser seroso, sanguinolento e até purulento. Os animais artríticos mostram andar difícil e claudicante, apresentam atraso no desenvolvimento e, às vezes, perda de peso, inapetência e ainda temperatura retal e corporal elevadas (Graciano et al., 2014). As articulações mais comumente afetadas são a tarso-falange, úmero-rádioulnar, fêmur-tíbio-patelar, coxo-femural e escapuloumeral (Tittiger e Alexander, 1971; Cross e Edwards, 1981).

A contaminação pode ocorrer nos primeiros dias de vida dos leitões, onde baias com pisos extremamente ásperos (concreto), molhados, compactos ou ripados, mas mantidos sujos (fezes da matriz e dos leitões) potencializam a contaminação bacteriana (Madec e Fourichon, 1990). Outros fatores predisponentes ainda podem ser o corte de dentes mal feitos (ferimentos nas gengivas, alicates sujos, mal desinfetados ou sem fio); o corte de umbigo sem a devida assepsia, ou cortado muito comprido (arrastando pelo piso da baia); e corte da cauda muito curto, provocando sangramento (Morés et al., 2000; Morés et al., 2003).

Em uma produção intensiva, o período de aleitamento é um constante desafio para os animais. O manejo de corte do umbigo, além de necessário, deve seguir processos certos, com uso de equipamentos corretos e soluções antissépticas adequadas, pois o simples fato de deixar o umbigo aberto pode gerar onfalites e outros tipos de inflamações como artrites. O corte da castração, quando feito com equipamentos não esterilizados, pode se tornar a porta de entrada para bactérias oportunistas. Além deste fato, machos castrados apresentam um nível maior de cortisol circulante quando comparados com não castrados, influenciando diretamente na eficiência de ativação do sistema imunológico. (Moya et al. 2008; Jayaraman e Nyachoti, 2017).

A marcação do rebanho, seja por mossa ou brinco, e até mesmo os manejos profiláticos e preventivos podem gerar processos inflamatórios por contaminação indireta. Nestes casos, os animais ficam susceptíveis a formas de contaminação secundária, pois suas defesas podem estar suprimidas e o manejo pode se tornar o principal meio de contaminação (Baker, 2011; Jayaraman e Nyachoti, 2017).

ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A artrite infecciosa leva a uma resposta imunológica de produção e mobilização de linfócitos, macrófagos, fibroblastos e principalmente citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas são produtos gerados por diversas células no local de infecção e têm função de influenciar na atividade, diferenciação, sobrevivência das células imunes, e regular a produção de outras citocinas. Atuam de forma parácrina e autócrina, por efeito cascata, influenciando na produção de mais citocinas. Essas substâncias ativam mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica, atuando sobre a produção e a resposta das citocinas. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se as interleucinas-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-7 e fator de necrose tumoral (FNT), que têm como função estimular os neutrófilos e macrófagos a secretarem espécies reativas de oxigênio (ERO) no líquido sinovial da articulação, para agirem como moderadores da lesão tecidual (Comar et al., 2013; Oliveira et al., 2011).

As ERO são encontradas no metabolismo aeróbio incompleto, em que o oxigênio molecular (O_2) sofre redução de forma incompleta, formando intermediários reativos, como superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ERO estão em equilíbrio com os agentes antioxidantes, porém durante um quadro de infecção, ocorre uma produção excessiva de ERO que agem sobre as próprias células do organismo (Andrade et al., 2010; Vasconcelos et al., 2007).

De maneira geral, a atuação do sistema antioxidante pode ser enzimática ou não enzimática. O sistema enzimático é representado pelas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) que atuam com a utilização da glutathione reduzida (GSH) como cofator (Vasconcelos et al., 2007). Há também o grupamento tiol, que em conjunto com pequenas moléculas, em especial cisteína, reduz as ERO através de um sistema cisteína/cistina (McBean, 2017).

Além do sistema antioxidante, há também a atuação do sistema imunológico no fígado, que será acionado no processo de inflamação. O funcionamento se dá pelo aumento ou diminuição da concentração sérica de proteínas de fase aguda devido ao dano tecidual. Ao correlacionar com outros métodos de avaliação, pode-se monitorar e confirmar a presença de infecções e atividade inflamatória (Cray; Zaias; Altman, 2009; Neto; Carvalho, 2009). Outro dano causado pelo estresse oxidativo é a oxidação de proteínas, induzida pelas ERO através de diversos mecanismos, formando as proteínas carboniladas (Vasconcelos et al., 2007).

SUBSTITUIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS POR ADITIVOS NATURAIS

O aumento das restrições do uso de antibióticos na produção de proteína animal devido a associação com bactérias resistentes e o posterior consumo humano desta proteína, causa grande anseio na pesquisa mundial para encontrar soluções viáveis que sejam usadas na produção intensiva. A restrição do uso de antibióticos na alimentação animal pode reduzir em até 15% a concentração de bactérias resistentes do organismo animal, beneficiando a saúde humana, porém ainda não existe relato do impacto desta alternativa na indústria de insumos e na produção mundial de proteína animal (Tang et al., 2017). Mediante relato de Saad e Ahmed (2018), o uso de antibiótico na produção animal ainda é fundamental. Neste sentido, pesquisadores buscam avaliar compostos que possam substituir totalmente ou parcialmente os antibióticos dietéticos da produção animal (Hoelzer et al., 2018).

Os antibióticos promotores de crescimento têm sido amplamente utilizados em dietas para suínos, especialmente em dietas de creche, para controlar a incidência de diarreia pós-desmame e para melhorar o desempenho de crescimento (Van Boeckel et al., 2015). As enzimas, os probióticos, os ácidos orgânicos, óleos essenciais ou a combinação (efeito sinérgico) são abordagens promissoras para substituição dos antibióticos da dieta animal. A eficiência da utilização de óleos essenciais dietéticos cresce dia após dia, pois o uso de novas tecnologias para implantação do óleo e outros compostos na dieta, potencializam as pesquisas mundiais (Omonijo et al., 2018).

Os compostos comumente pesquisados para suínos são o carvacrol, o timol, citral, eugenol, cinamaldeído. Estão dentro do grupo de óleos essenciais e podem causar danos na parede celular de alguns tipos de bactérias, sendo que cada um pode apresentar resultados diferentes no organismo animal (Yap et al., 2014). Foi exposto em um trabalho realizado por Yang et al (2015), as concentrações mínimas de óleos essenciais contra vários patógenos bacterianos, demonstrando resultados promissores que estimulam mais pesquisas. Os óleos essenciais podem proporcionar vários benefícios a saúde animal e humana, sendo uma alternativa promissora uso em substituição aos antibióticos (Tang et al., 2017).

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM DIETAS PARA LEITÕES

O uso de aditivos naturais para o controle de doenças em humanos, plantas e animais é de interesse científico e industrial. O avanço da tecnologia traz benefícios para identificação e caracterização de componentes bioativos presentes nas plantas, além de melhorar o entendimento sobre o mecanismo de ação para o uso preciso no campo de pesquisa e indústria (Costa et al., 2013).

Promotores de crescimento são usados para melhorar o desempenho dos leitões durante o período de desmame. Contudo, a possível resistência cruzada bacteriana limitou o uso de antibióticos como promotores de crescimento (Brenes e Roura, 2010). Assim, o potencial de extratos vegetais, óleos essenciais, e seus compostos purificados está sendo investigado como alternativa estratégica de alimentação para melhorar o desempenho dos animais desmamados durante esse período (Hashemi e Davoodi, 2011).

Os óleos essenciais podem apresentar atividade antimicrobiana e várias outras características como antitumoral, antifúngica e antioxidante (Bendaoud et al., 2010; Johann et al., 2010; Matsuo et al., 2011). O aumento de restrições referentes ao uso de promotores de crescimento na produção animal (Mapa, 2020), é o principal fator que impulsiona o uso de óleos essenciais nas pesquisas para aprimorar ou até mesmo manter os padrões de desempenho animal em produção livre de antibióticos.

Além de promotor de crescimento, os óleos essenciais atuam também no tratamento terapêutico de doenças gastrointestinais em leitões recém-desmamados, pois apresentam a capacidade de modular a flora microbiana. (Dong et al., 2019). Em estudo com leitões, a substituição completa de antibiótico por um blend contendo óleos essenciais, com inclusão de 0,2%, melhorou o desempenho e causou efeito imunomodulador positivo nestes animais (Xu et al., 2020).

Em estudo com leitões, a substituição parcial de antibiótico por um blend contendo óleos essenciais, com inclusão de 0,2%, melhorou o desempenho e causou efeito imunomodulador positivo nestes animais (Xu et al., 2020). Além de auxiliar no crescimento, os óleos essenciais atuam também no tratamento terapêutico de doenças gastrointestinais em leitões recém-desmamados, pois apresentam a capacidade de modular a flora microbiana (Dong et al., 2019).

A modulação microbiana causada pelos óleos essenciais está fortemente ligada à sua hidrofobicidade. O mecanismo de ação é diferente entre os tipos de bactérias, mas o princípio é o mesmo: causar perturbação na permeabilidade da membrana celular e na

homeostase pela perda de componentes celulares, influxo de outras substâncias, podendo levar à apoptose celular (Figura 1-A) (O'Bryan et al., 2015). Embora os resultados sobre desempenho não sejam perceptíveis nas fases jovens, o uso de óleos essenciais em leitões pode gerar resultados satisfatórios a longo prazo (Figura 1-B) (Barreto, 2019).

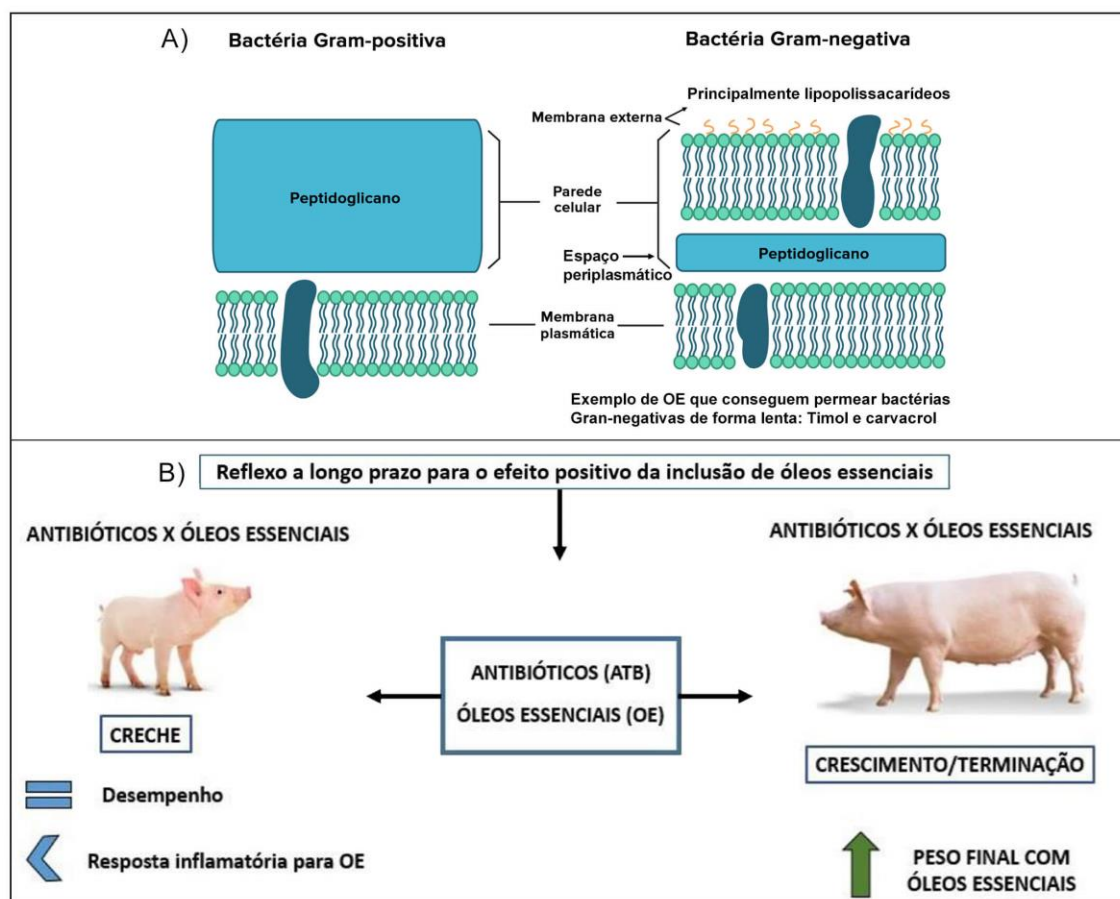


Figura 1. Diferença entre a membrana de células Gram-positivas e Gram-negativas que influencia no mecanismo de ação dos óleos essenciais (A). Principais efeitos do uso de óleos essenciais em substituição aos antibióticos melhoradores de desempenho para suínos na fase de creche, crescimento e terminação (B). Fonte: Adaptado de Barreto (2019).

A parede celular de bactérias Gram-positivas é constituída principalmente de peptidoglicanos ligados a outras moléculas, como proteínas, fato que facilita a atuação de compostos hidrofóbicos encontrados nos óleos essenciais. Já Bactérias Gram-negativas são constituídas principalmente por lipopolissacarídeos hidrofílicos e uma fração menor de peptidoglicanos, o que dificulta a ação dos óleos essenciais, resultando

em diferentes respostas fisiológicas (O'Bryan et al., 2015, Zhai et al., 2018; Yang et al., 2019).

Sendo assim, a suplementação dietética com blend de óleos essenciais é utilizada para substituir de forma parcial ou total os antibióticos da dieta animal. Em dietas para leitões, por exemplo, a substituição total da tilosina pode aprimorar o ganho de peso pós-desmame, melhorar as características das fezes e aumentar a digestibilidade dos nutrientes devido a modulação microbiana (Huang et al., 2010), sendo que os principais resultados para leitões em fase de creche são referentes à resposta imunológica (Barreto, 2019).

Existe certa cautela nas pesquisas para determinar com exatidão os mecanismos de ação antimicrobiana do óleo essencial *in vivo* devido a gama de microorganismos presente no sistema digestório destes animais e a dinâmica de modulação causada por fatores extrínsecos, por isso a abordagem destes compostos na alimentação animal predomina como promotores de crescimento, no entanto, alguns mecanismos de ação antimicrobiana já são estabelecidos *in vitro* (Vanrolleghem et al., 2019).

Pesquisas antigas já revelaram que os óleos essenciais de orégano, tomilho, coentro, cravo, laranja e seus compostos geralmente são hidrofóbicos e podem ter características de perturbação da membrana ou mesmo de ruptura de membrana de alguns grupos de bactérias, como citado acima (Helander et al., 1998). No entanto, *in vivo*, as concentrações para a apoptose das células são muito acima do limite de sabor tolerável pelos animais. Portanto, na prática, a maioria dos óleos essenciais são utilizados em concentrações que podem apenas ter efeitos de inibição do crescimento de microrganismo (Brul e Coote, 1999).

Em uma série de estudos, os efeitos dos óleos essenciais na inflamação, estresse oxidativo, microbioma, quimiossensibilização intestinal levaram a um melhor desempenho de produção de animais alimentados com óleos essenciais. Foi demonstrado que os óleos essenciais são boas alternativas de antibióticos em rações para a produção de suínos, pois possuem propriedades que, além de ação moduladora de microrganismos, também atuam como agentes antioxidantes (Omonijo et al., 2018). Justamente, mais estudos que avaliem diferentes fontes e níveis de óleos essenciais em dietas para suínos são importantes para aderir eficientemente as constantes adequações referentes a saúde, bem estar, viabilidade e aprimoramento da produção.

ÓLEO DE LARANJA (LIMONENO)

A laranja é amplamente comercializada no Brasil, principalmente nos Estados de São Paulo e Paraná. A maior parte desta produção é direcionada ao mercado de suco, tanto para exportação quanto para demanda interna. O bagaço se torna um resíduo neste processo, porém sua comercialização para alimentação animal pode ser realizada de modo *in natura* ou desidratada. Um coproduto que se destaca nesse resíduo é o óleo da casca, onde se encontra a maior concentração de óleo na fruta (De Barros et al., 2019).

O D-limoneno ou limoneno (Figura 2) é um dos terpenos mais comuns da natureza. É um constituinte importante em vários óleos cítricos (laranja, limão, tangerina, limão e toranja). Este composto é principalmente caracterizado como agente aromatizante e pode ser encontrado em alimentos comuns, como sucos de frutas, refrigerantes, sorvetes, pudins, balas e também em cosméticos como shampoos e cremes (Sun et al., 2007; Wang et al., 2012). A grande maioria dos terpenos está no óleo da laranja, sendo o limoneno o mais abundante.

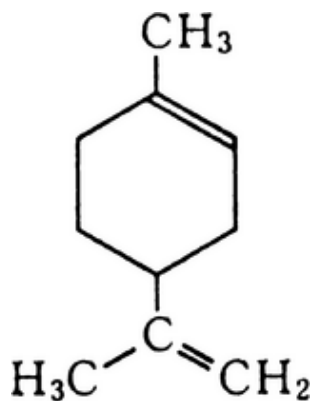


Figura 2. Estrutura do limoneno (1-metil-4- (1-metiletenil)) (Murali et al., 2012)

O resíduo industrial da laranja é amplamente reaproveitado pela indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos. A captação do limoneno é convencionalmente realizada por extração usando solvente hexano. Também pode ser realizada destilação a vapor, extração por micro-ondas e outros, porém vários estudos buscam alternativas sempre mais eficientes que reduzem os custos e os impactos por uso de solventes orgânicos, para obtenção mais pura possível deste composto (Sun et al., 2009; Ozturk et al., 2019).

Algumas variáveis como tipo de reagentes, temperatura e equipamentos podem influenciar na pureza do produto final, pois o óleo é altamente volátil e inicialmente se

encontra de forma complexada à casca da laranja (Filly et al., 2015; Bonon et al., 2020). Após a extração mais eficiente, o limoneno é amplamente utilizado em pesquisas que exploram a sua atuação em vias metabólicas promovendo bem estar e aprimorando efeitos benéficos à saúde (Vieira et al., 2018).

Ainda são necessários mais estudos sobre a atuação *in vivo* do limoneno, porém já existem algumas evidências no seu uso para controle de diabetes. O limoneno tem um papel na inibição da atividade da enzima aldose redutase, atrasando o desenvolvimento de cataratas decorrente da diabetes em ratos (Kumar et al., 2020). Outros estudos afirmaram o uso do limoneno como agente antioxidante que reduz a peroxidação lipídica e otimiza a atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase (Murali, 2013; Bai et al., 2016).

Em alguns casos, o limoneno não apresenta efeito antibacteriano clinicamente significativo, mas pode modular a ação dos antibióticos contra as bactérias resistentes a múltiplas drogas (De Araújo et al., 2020). Essa modulação e controle bacteriano pode auxiliar na preservação de alimentos (Shao et al., 2018) e na redução de crescimento de bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis* e outras cepas fúngicas como *Aspergillus flavus* e *Trichophyton alba* (Khan et al., 2012), demonstrando sua ampla atuação sinérgica à saúde e bem estar de humanos e animais.

É necessária a microencapsulação do limoneno para que ele seja adicionado em dietas para animais, pois no estado líquido os compostos bioativos são altamente voláteis no meio, se tornando inviável a utilização (Song et al., 2018). Para isso, são utilizados equipamentos como Spray Dryer. O óleo extraído é misturado com carboidratos altamente solúveis, água e emulsificantes para que seja secado no equipamento. Essa ação previne a evaporação e auxilia na preservação do óleo no trato digestório, promovendo maior utilização do aditivo (Rubiano et al., 2015). Mediante o constante cenário de restrição do uso de antibióticos na dieta animal, a aplicação de novas tecnologias para se obter mais eficiência na utilização de aditivos orgânicos, como limoneno, estimula a criação de novas pesquisas (Tang et al., 2017). Declarada a importância do uso de moduladores microbianos na produção intensiva de suínos, a linha de pesquisa para as fontes alternativas se torna fundamental neste contexto (Saad e Ahmed, 2018).

REFERÊNCIAS

- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual de 2018**. p 68-98, 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>
- AHMADY, Sharare; REZAEI, Mansour; KHATONY, Alireza. Comparing effects of aromatherapy with lavender essential oil and orange essential oil on fatigue of hemodialysis patients: A randomized trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 36, p. 64-68, 2019.
- ALBERTON, G.C.; BANDARRA, E.P.; PIFFER, I.; MORES, M.A.Z.; PEREIRA, M.A.C.; YAMAMOTO, M.T. Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e físico-químico das articulações de suínos artríticos no matadouro. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.1, p.81-91, 2003.
- ANDRADE, E.R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ANDRADE, T.V.; SOUZA, P.H.A.A.; BARROS JÚNIOR, C.P.; BORGES, L.S.; CARVALHINHO, S.T.; SILVA, A.L.; FARIAS, L.A.; DOURADO, L.R.B.; LIMA, S.B.P. Aspectos Relacionados ao Bem-Estar Animal na Produção de Suínos. **Journal of Animal Behaviour and Biometerology**. v. 3, p.124-127, 2015.
- ANTUNES, R. C. **O ensino da produção industrial de suínos - uma versão crítica**. 1a ed.: Edibrás. Uberlândia, MG. p. 29-60, 2018.
- BAI, Jie et al. Protective effect of D-limonene against oxidative stress-induced cell damage in human lens epithelial cells via the p38 pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- BAKER, Rodney B. *Biosecurity of Pigs and Farm Security*. 2011.
- BARRETO, L., 2019. Programa de uso terapêutico e subterapêutico de óleos essenciais em substituição aos antibióticos para suínos.
- BENDAOU, Houcine et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. C466-C472, 2010.
- BONON, Anderson J. et al. Green Catalytic Epoxidation System: High Selectivity Production and Characterization of Limonene Diepoxide for Potential Biomedical Applications. **Catalysis Today**, 2020.
- BRENES, Agustín; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.
- BRUL, Stanley; COOTE, Peter. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 1-17, 1999.

- CAMPBELL, JM; CRENSHAW, JD; POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 19, 2013.
- COMAR, J.F. *et al.* Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 58, p. 144-153, 2013.
- COSTA, L. B. *et al.* Herbal extracts and organic acids as natural feed additives in pig diets. **South African Journal of Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 181-193, 2013.
- CRAY, C.;ZAIAS, J.; ALTMAN, N.H. Acute Phase Response in Animals: A Review. **Comparative Medicine**, v.59, n. 6, p.517-526, 2009.
- CROSS, G.M.; EDWARDS, M.J. 1981.The detection of arthritis in an abattoir and its public health significance. **Australian Veterinary Journal**, v.57, p.153-158.
- DAVIS, J.L. 2004.Tangerine peels may lower Cholesterol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, May 12th.
- DE ARAÚJO, Ana Carolina Justino *et al.* GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the Mikania cordifolia essential oil and limonene against MDR strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111023, 2020.
- DE BARROS, José Roberto Mendonça; DE BARROS, Alexandre Lahoz Mendonça; CYPRIANO, Marcelo Petersen. O mercado da citricultura no Brasil e as suas novas perspectivas. 2019.
- DIAS, C.P.; SILVA, C.A.; MANTECA, X. **Bem-estar dos suínos**. Londrina: Midiograf, 2014, 403p.
- DONG, Li *et al.* Dietary tea tree oil supplementation improves the intestinal mucosal immunity of weanling piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 255, p. 114209, 2019.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68.
- FILLY, Aurore *et al.* Alternative solvents for extraction of food aromas. Experimental and COSMO-RS study. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 33-40, 2015.
- FRANZ, C.; BASER, K.H.C.; WINDISCH, W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 327-340.
- FRIEDE, I.; SEGALL, T. 1996. Inflammation of the joint at growing fattening pigs. **Svensk Veterinar Tidning**, v.48, p.453–457.
- GOMEZ, L. A. C, HERRERA, A. L., & SUESCUN, J. E. P. La inclusión de cepas probióticas mejora los parámetros inmunológicos en pollos de engorde. **Ces Medicina Veterinaria y Zootecnia**, 10(2),160-169, 2015.

- GRACIANO, D.E. et al. Identificação de artrite em suíno utilizando imagem termográfica. **Boletim de Indústria Animal**, v. 71, n. 1, p. 79-83, 2014.
- HASHEMI, Seyed Reza; DAVOODI, Homa. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 3, p. 169-180, 2011.
- HILL, M. Skeletal System and feet. In: LEMAN A.; STRAW B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. 1992. (Orgs). **Diseases of swine**. 7th ed. Iowa: Iowa State University Press, p.163-195.
- HOELZER, K. et al. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: challenges and needs. **Veterinary Research**, v. 49, n.1, p.64, 2018.
- HUANG, Y. et al. Effects of dietary supplementation with blended essential oils on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles and fecal characteristics in weanling pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n.5, p. 607-613, 2010.
- JOHANN, Susana et al. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2010.
- JONHSTON, K.M.; DOIGE, C.E.; OSBORNE, A.D. 1987. An evaluation of nonsuppurative joint disease in slaughter pigs. **Canadian Veterinary Journal**, v.28, p.174-180.
- KHAN, Muhammad Mumtaz et al. Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 6, p. 972-979, 2012.
- KUMAR, Munipally Praveen et al. Effects of D-Limonene on aldose reductase and protein glycation in diabetic rats. **Journal of King Saud University-Science**, 2020.
- MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 13 DE JANEIRO DE 2020.
- MATSUO, Alisson L. et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n. 2, p. 449-454, 2011.
- MCBEAN, G.J. Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. **Antioxidants**, v.6, n. 3, p. 62, 2017.
- MONTAGNE, L.; PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.108, n. 1-4, p. 95-117, 2003.

- MORÉS, N.; PIEROSAN, R.; AMARAL, A.L.; BARIONI JÚNIOR, W. 2003. Fatores de risco associados com artrites em suínos de abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.528- 532.
- MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; BARIONI JUNIOR, W. et al. 2000. Fatores de risco associados aos problemas dos leitões na fase de creche em rebanhos da região sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.191-199.
- MURALI, Ramakrishnan; KARTHIKEYAN, Arumugam; SARAVANAN, Ramalingam. Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 3, p. 175-181, 2013.
- NETO, N.S.R.; CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 4, p. 413-430, 2009.
- O'BRYAN, C. A., PENDLETON, S. J., CRANDALL, P. G., & RICKE, S. C., 2015. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—in vitro studies on antibacterial mode of action. **Frontiers in Veterinary Science**, 2, 35.
- OLIVEIRA, C.M.B. *et al.* Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n. 2, p. 255-265,2011.
- OMONIJO, F.A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v.4, n.2, p.126-136, 2018.
- OZTURK, B. et al. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.151, p.107298, 2019.
- PLUSKE, J.R., LE DIVIDICH, J. & VERSTEGEN, M.W.A. **Weaning the pig: concepts and consequences**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers. 2003.
- RUBIANO, Karla et al. Evaluación de las propiedades termodinámicas y térmicas del d-limoneno encapsulado mediante secado por aspersión. 2015.
- SAAD, M.M.E.D., & AHMED, M.B.M. Necessary Usage of Antibiotics in Animals. **Antibiotic Use in Animals**, 9, 2018.
- SHAO, Ping et al. Antibacterial activities of R-(+)-Limonene emulsion stabilized by Ulva fasciata polysaccharide for fruit preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1273-1280, 2018.
- SONG, Zhanlong et al. Characteristics of limonene formation during microwave pyrolysis of scrap tires and quantitative analysis. **Energy**, v. 142, p. 953-961, 2018.
- SUN, Hong et al. Essence oil extracted from orange peel by microwave* assisted method. **Journal of Qiqihar University (Natural Science Edition)**, v. 5, 2009.
- SUN, Jidong. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259, 2007.

- TARTRAKOON, WANDEE et al. 2009. Nutrient digestibility coefficient of weaner pigs fed diets supplemented with essential oil mixtures as feed additive. **Journal of ISSAAS - International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**.
- TITTIGER, F.; ALEXANDER, D.C. 1971. Studies on the bacterial flora of condemned portions from arthritic hogs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.35, p.244-248.
- VAN BOECKEL, T.P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.18, p.5649-5654, 2015.
- VANROLLEGHEM, W. et al. Potential dietary feed additives with antibacterial effects and their impact on performance of weaned piglets: A meta-analysis. **The Veterinary Journal**, v. 249, p. 24-32, 2019.
- VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VIEIRA, Ana Julia et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018.
- WANG, Wen-yuan et al. The application and study on Iimonene of orange peel [J]. **Fine and Specialty Chemicals**, v. 5, 2012.
- XU, Yetong et al. Micro-encapsulated essential oils and organic acids combination improves intestinal barrier function, inflammatory responses and microbiota of weaned piglets challenged with enterotoxigenic Escherichia coli F4 (K88+). **Animal Nutrition**, 2020.
- YANG, C., ZHANG, L., CAO, G., FENG, J., YUE, M., XU, Y., & GUO, X., 2019. 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(1), 133-143.
- YAP, P.S.X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v.8, n.6, 2014.
- ZHAI, H., LIU, H., WANG, S., WU, J., & KLUENTER, A. M., 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, 4(2), 179-186.

III. OBJETIVOS

- Determinar um protocolo de indução de artrite por meio de adjuvante completo, para leitões em fase de aleitamento, com base em variáveis morfológicas, temperatura superficial, estado oxidativo do fígado e plasma, proteínas de fase aguda e infiltração de leucócitos no líquido sinovial de leitões;
- Determinar o teor de compostos bioativos (polifenóis totais e flavonoides) do óleo essencial de laranja;
- Avaliar o desempenho zootécnico de leitões recém-desmamados, com ou sem artrite induzida, alimentados com rações contendo óleo essencial de laranja;
- Avaliar efeito do óleo essencial de laranja (limoneno) em leitões desmamados, com ou sem artrite induzida, sobre a temperatura local e variáveis morfológicas das articulações (perímetro, diâmetro e volume);
- Avaliar efeito do óleo essencial de laranja (limoneno) para leitões desmamados, com ou sem artrite induzida, sobre as variáveis sanguíneas (glicose, ureia, albumina, proteínas totais, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL, VLDL), globulinas, hematócrito e contagem diferencial leucocitária;
- Avaliar efeito do óleo essencial de laranja (limoneno) para leitões desmamados, com ou sem artrite induzida, sobre o estado oxidativo do plasma (proteínas carboniladas, grupos sulfidrilas reduzidos de proteínas - tióis reduzidos), capacidade antioxidante total – ABTS e DPPH) e status REDOX - atividade de glutathiona reduzida - GSH e oxidada - GSSG).

ARTIGO 1**Protocolos para indução de artrite em leitões lactentes e seus efeitos sobre as variáveis morfológicas, estado oxidativo e resposta inflamatória após o desmame¹**

Resumo - Este trabalho foi realizado com objetivo de avaliar diferentes protocolos para indução de artrite em leitões lactentes sobre o peso vivo, temperatura superficial, variáveis morfológicas articulares, estado oxidativo no plasma e fígado, concentração sérica de proteínas de fase aguda e infiltração de leucócitos no líquido sinovial de leitões desmamados. Foram utilizadas 48 fêmeas suínas mestiças, com idade inicial de 7 dias e peso médio inicial de $1,76 \pm 0,28$ kg. Metade desses animais (n=24) foi submetida à indução de artrite, na articulação tarso-falange do membro posterior direito, através de injeção intradérmica de adjuvante completo de FREUND (*Mycobacterium tuberculosis* derivadas de cepa humana H37Rv e inativadas pelo calor, suspendidas em óleo mineral 0,5% (w/v)). Foram testados os protocolos de aplicação I (7 dias de idade - 0,1 mL de adjuvante), II (7 e 14 dias de idade - 0,2 mL de adjuvante), III (14 e 21 dias de idade - 0,2 mL de adjuvante) e IV (7, 14 e 21 dias de idade - 0,3 mL de adjuvante). A outra metade dos animais (n=24) foi submetida ao mesmo manejo, mas com aplicações de soro fisiológico (0,9%). Todos os animais foram desmamados aos 21 dias e alojados individualmente em creche por 15 dias, para as avaliações pós-desmame. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro protocolos de indução do grupo positivo (adjuvante) e quatro do controle (soro fisiológico), seis repetições por tratamento e um animal por unidade experimental. As avaliações de peso vivo, temperatura superficial e morfologia articular foram realizadas no dia do desmame (dia 0), aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias pós desmame. No último dia, realizou-se a colheita de sangue para determinação plasmática de GSH, TAC, tióis e proteínas carboniladas, e dosagem sérica das proteínas de fase aguda, além de coleta de fígado para determinação da catalase, SOD e proteínas carboniladas e de líquido sinovial para a contagem de leucócitos. Todos os protocolos de indução de artrite por adjuvante avaliados em leitões na fase de aleitamento resultam em elevação da temperatura superficial, alterações das variáveis morfológicas articulares, estresse oxidativo no plasma e fígado, alterações na concentração sérica de proteínas de fase aguda e na infiltração de leucócitos no líquido sinovial após o desmame.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Inflamação articular; Proteínas de fase aguda

¹ Artigo redigido conforme normas da revista *Arthritis & Rheumatology* (ISSN: 2326-5205).

33 Abstract - This work was carried out with the objective of evaluating different protocols
34 for inducing arthritis in suckling piglets on live weight, surface temperature, joint
35 morphological variables, oxidative state in plasma and liver, protein serum concentration
36 in acute phase and leukocyte infiltration in the synovial fluid of weaned piglets. 48
37 crossbred swine females were used, with an initial age of 7 days and an average initial
38 weight of 1.76 ± 0.28 kg. Half of these animals ($n = 24$) underwent arthritis induction, in
39 the tarsal phalanx joint of the right posterior limb, through intradermal injection of
40 complete FREUND adjuvant (Mycobacterium tuberculosis derived from human H37Rv
41 strain and inactivated by heat, suspended in oil mineral 0.5% (w/v)). The application
42 protocols evaluated were: I (7 days of age - 0.1 ml of adjuvant), II (7 and 14 days of age
43 - 0.2 ml of adjuvant), III (14 and 21 days of age - 0.2 mL of adjuvant) and IV (7, 14 and
44 21 days of age - 0.3 mL of adjuvant). The other half of the animals ($n = 24$) were submitted
45 to the same management, but with saline applications (0.9%). All animals were weaned
46 at 21 days and housed individually in a nursery for 15 days, for post-weaning assessments.
47 The experimental design was in randomized blocks, with four protocols for induction of
48 the positive group (adjuvant) and four of the control (saline), six replicates per treatment
49 and one animal per experimental unit. Assessments of live weight, surface temperature
50 and joint morphology were performed on the day of weaning (day 0), at 3, 6, 9, 12 and
51 15 days after weaning. On the last day, blood was collected for plasma determination of
52 GSH, TAC, thiols and carbonylated proteins, and proteins serum measurement of acute
53 phase, in addition to liver collection to determine catalase, SOD and carbonylated and
54 liquid synovial for leukocyte count. All adjuvant arthritis induction protocols evaluated
55 in suckling piglets result in elevated surface temperature, changes in joint morphological
56 variables, oxidative stress in plasma and liver, changes in proteins serum concentration
57 of acute phase and leukocyte infiltration in synovial fluid after weaning.

58 Keywords: Oxidative stress; Joint inflammation; Acute phase proteins.

59

60

Highlights

61 1- Não existe um protocolo de indução de artrite padronizado para suínos.

62 2- O uso de adjuvante completo de FREUND é capaz de induz artrite em leitões lactentes.

63 3- Induções aos 7 dias, 7 e 14 dias, 14 e 21 dias, 7, 14 e 21 dias foram avaliados.

64 4- Todos os protocolos resultam na manifestação da doença na fase pós-desmame.

65

66 **1. Introdução**

67

68 As artrites são enfermidades que podem acometer os suínos em qualquer faixa
69 etária, causando perdas econômicas por atraso no crescimento, descarte precoce de
70 reprodutores, gastos com medicamentos, mão de obra, formação de animais refugos,
71 óbitos ou condenação de carcaças nos abatedouros.

72 As principais causas de artrite nos suínos jovens são a infecção por *Streptococcus*
73 *sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pasteurella*
74 *multocida*, entre outros agentes (Jonhston et al., 1987; Friede & Segall, 1996). As áreas
75 afetadas apresentam-se inflamadas, com febre local, articulações inchadas, com presença
76 de exsudato, que pode ser seroso, sanguinolento e até purulento. Os animais artríticos
77 mostram andar difícil e claudicante, apresentam atraso no desenvolvimento e, às vezes,
78 perda de peso, inapetência e ainda temperatura retal e corporal elevadas (Graciano et al.,
79 2014; Zimmerman et al., 2012). As articulações mais comumente afetadas são a tarso-
80 falange, úmero-rádioulnar, fêmur-tíbio-patelar, coxo-femural e escápuloumeral (Tittiger
81 & Alexander, 1971; Cross & Edwards, 1981).

82 A contaminação mais recorrente ocorre nos primeiros dias de vida dos leitões, em
83 que as baias com pisos extremamente ásperos (concreto), molhados, compactos ou
84 ripados, mas mantidos sujos (fezes da matriz e dos leitões) potencializam a contaminação
85 bacteriana (Madec & Fourichon, 1990). Outros fatores predisponentes ainda podem ser o
86 corte de dentes mal feitos (ferimentos nas gengivas, alicates sujos, mal desinfetados ou
87 sem fio); o corte de umbigo sem a devida assepsia, ou cortado muito comprido (arrastando
88 pelo piso da baia); e corte da cauda muito curto, provocando sangramento (Morés et al.,
89 2000; Morés et al., 2003).

90 A artrite infecciosa desencadeia uma resposta imunológica de produção e
91 mobilização de linfócitos, macrófagos, fibroblastos e principalmente citocinas pró-
92 inflamatórias, que têm como função estimular os neutrófilos e macrófagos a secretarem
93 espécies reativas de oxigênio (ERO) no líquido sinovial da articulação, para agirem como
94 moderadores da lesão tecidual (Comaret *al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2011). O excesso de
95 ERO pode desencadear estresse oxidativo, o que ativa o sistema de defesa antioxidante.

96 Além do sistema antioxidante, há também a atuação do sistema imunológico no
97 fígado, que será acionado no processo de inflamação. O funcionamento se dá pelo

98 aumento ou diminuição da concentração sérica de proteínas de fase aguda devido ao dano
99 tecidual (Cray; Zaias; Altman, 2009; Neto; Carvalho, 2009). O conjunto de parâmetros
100 de estresse oxidativo e de defesa inflamatória permite diagnóstico mais preciso sobre a
101 condição de sanidade do organismo.

102 Considerando a necessidade de padronização de um método para indução de
103 inflamações articulares em leitões, para uso em pesquisas que busquem mitigar seus
104 efeitos, o presente estudo foi realizado com objetivo de avaliar a temperatura superficial
105 e variáveis morfológicas nas articulações, estado oxidativo no plasma e fígado,
106 concentração sérica de proteínas de fase aguda e infiltração de leucócitos no líquido
107 sinovial de leitões pós-desmame, com artrite induzida por adjuvante na fase de lactação.

108

109 **2. Material e métodos**

110

111 *Geral*

112

113 O experimento foi realizado no Setor de Suinocultura da Fazenda Experimental de
114 Iguatemi (FEI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de
115 Maringá (CCA/UEM), localizada no Estado do Paraná (23°21'S, 52°04'W e altitude de
116 564m). Todos os procedimentos experimentais foram previamente submetidos à
117 apreciação do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação
118 (CEUA/UEM), tendo sido aprovados para execução (Parecer nº 2086220217).

119

120 *Animais, tratamentos e dietas*

121

122 Foram utilizadas 48 fêmeas suínas mestiças (Topigs x AGPIC 425), de alto
123 potencial genético e desempenho superior, em fase de aleitamento, com idade inicial de
124 7 dias e peso médio inicial de $1,76 \pm 0,28$ kg. O adjuvante (grupo positivo) ou soro
125 fisiológico (grupo controle) foi fornecido aos animais na fase de aleitamento, enquanto
126 permaneciam nas instalações de maternidade.

127 Metade desses animais (n=24) foi submetida à indução de artrite, na articulação
128 tarso-falange do membro posterior direito, através de injeção intradérmica de 0,1 mL de
129 adjuvante completo de FREUND (*Mycobacterium tuberculosis* derivadas de cepa
130 humana H37Rv e inativadas pelo calor, suspensas em óleo mineral 0,5% (w/v))
131 (Pearson & Wood, 1963).

132

133 Os protocolos de aplicação testados foram os seguintes:

134 Protocolo I: total de 1 aplicação aos 7 dias de idade (uso de 0,1 mL de adjuvante);

135 Protocolo II: total de 2 aplicações, aos 7 e 14 dias de idade (uso de 0,2 mL de
136 adjuvante);

137 Protocolo III: total de 2 aplicações, aos 14 e 21 dias de idade (uso de 0,2 mL de
138 adjuvante);

139 Protocolo IV: total de 3 aplicações, aos 7, 14 e 21 dias de idade (uso de 0,3 mL de
140 adjuvante).

141

142 A outra metade dos animais (n=24) foi submetida ao mesmo manejo, porém com
143 aplicações de soro fisiológico (0,9%). Durante o período de lactação, todos os animais
144 receberam ração pré-inicial I (Tabela 1), a partir dos 7 dias de idade, e água à vontade.

145 Todos os animais foram desmamados aos 21 dias de idade e alojados
146 individualmente em baias individuais suspensas de 1,32 m² (1,50 x 1,70 m), separadas
147 entre si por divisória de grades de ferro, com comedouros frontais semiautomáticos e
148 bebedouros tipo nipple, localizadas em creche de alvenaria, com piso misto (concreto
149 maciço e polietileno vazado) e telha de amianto, com ventiladores de parede, cortinas
150 basculantes de lona e lâmpadas incandescentes. Durante os 15 dias de avaliações pós
151 desmame, todos os animais receberam ração pré-inicial II (Tabela 1), formulada para
152 suprir as exigências nutricionais de leitões dos 7 aos 11 kg (NRC, 2012), e água à vontade.

153 Como protocolo sanitário prévio de limpeza da creche experimental, primeiramente
154 foi retirada a matéria orgânica aderida às grades de metal, comedouros, chão e paredes,
155 com o auxílio de espátula e bomba d'água de alta pressão. Posteriormente, a sala foi
156 desinfetada com vassoura de fogo (após secagem), solução de cal aplicada no piso e
157 paredes, além de solução de hipoclorito 1:20. Depois de desinfetada, a sala foi mantida
158 em vazio sanitário por sete dias, em média.

159 A sala de creche foi equipada com um termohigrômetro digital, e as temperaturas
160 mínima e máxima médias registradas foram de 20,4 ± 5,4°C e 28,4 ± 4,8°C,
161 respectivamente. A umidade relativa oscilou entre 51,1% ± 6,1 e 77,3% ± 9,7.

162

163 **Tabela 1.** Composição centesimal, química e energética das rações pré-iniciais I e II.

Ingredientes (g/kg de matéria natural)	Pré-inicial I	Pré-inicial II
Milho grão	370,00	450,00
Farelo de soja	230,00	300,00

Núcleo Pré-inicial ^{1,2}	400,00	250,00
Composição calculada		
Energia metabolizável (Mcal/kg)	3,40	3,30
Proteína bruta (g/kg)	177,50	150,55
Lactose (g/kg)	72,88	48,56
Fibra bruta (g/kg)	20,41	25,45
Fibra em detergente neutro (g/kg)	103,52	121,13
Fibra em detergente ácido (g/kg)	42,41	51,22
Cálcio (g/kg)	8,03	7,12
Fósforo disponível(g/kg)	4,05	3,85
Sódio (g/kg)	3,52	2,99
Potássio (g/kg)	2,83	2,41
Cloro (g/kg)	4,51	3,83
Lisina digestível (g/kg)	13,51	11,48
Met+Cis digestível (g/kg)	7,42	6,31
Metionina digestível (g/kg)	3,90	3,32
Treonina digestível (g/kg)	7,91	6,72
Triptofano digestível (g/kg)	2,21	1,88

164 ¹ Composição básica do produto: Soja integral desativada, Proteína concentrada de soja, Milho Pré-
165 gelatinizado, Soro de leite em pó, Gordura vegetal hidrogenada, Calcário calcítico, Fosfato bicálcico,
166 Cloreto de sódio, Filito, Sulfato de cobalto, Sulfato de cobre, Sulfato de ferro, Iodato de cálcio, Óxido de
167 manganês, Selenito de sódio, Óxido de zinco, Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina K3,
168 Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina B12, Ácido fólico, Ácido nicotínico, Ácido
169 pantotênico, Cloreto de colina, Biotina, Aditivo acidificante, Aditivo aromatizante, Aditivo antioxidante,
170 Aditivo enzimático, L-lisina, DL-metionina, L-treonina, L-triptofano, L-valina e Açúcar.

171 ² Níveis de garantia/kg do produto: Proteína bruta: 160 g (mín.), Extrato etéreo: 50 g (mín.), Fibra bruta:
172 25 g (máx.), Cálcio: 13 / 17 g (mín. / máx.), Fósforo: 7.000 mg (mín.), Sódio: 7.000 mg (mín.), Matéria
173 mineral: 130 g (máx.), Cobalto: 2 mg (mín.), Cobre: 375 mg (mín.), Ferro: 375 mg (mín.), Iodo: 4,5 mg
174 (mín.), Manganês: 137 mg (mín.), Selênio: 1 mg (mín.), Zinco: 6.780 mg (mín.), Vitamina A: 31.200 UI
175 (mín.), Vitamina D3: 6.250 UI (mín.), Vitamina E: 100 UI (mín.), Vitamina K3: 7,5 mg (mín.), Vitamina
176 B1: 7,5 mg (mín.), Vitamina B2: 12,5 mg (mín.), Vitamina B6: 7,5 mg (mín.), Vitamina B12: 150 mcg
177 (mín.), Ácido fólico: 1,5 mg (mín.), Ácido nicotínico: 87,5 mg (mín.), Ácido pantotênico: 55 mg (mín.),
178 Colina: 1.670 mg (mín.), Biotina: 0,25 mg (mín.), Lisina: 18 g (mín.), Metionina: 8.200 mg (mín.).

179

180

181 ***Delineamento experimental***

182

183 O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro
184 protocolos de indução do grupo teste (adjuvante) e quatro do grupo controle (soro
185 fisiológico), com 6 repetições por tratamento e um animal por unidade experimental. As
186 avaliações de peso vivo, temperatura superficial e morfologia articular foram realizadas
187 no dia do desmame (dia 0), e aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias pós desmame. As coletas de sangue,
188 fígado e líquido sinovial foram realizadas no último dia, 15º dia após o desmame.

189

190 ***Avaliações morfológicas e temperatura superficial***

191

192 Ao longo dos dias de avaliação, os animais foram pesados e foram tomadas as
193 medidas do perímetro e diâmetro da articulação tarso-falange do membro posterior
194 direito. Para tanto, o perímetro foi obtido com auxílio de fita métrica graduada em
195 centímetros, enquanto o diâmetro foi mensurado com auxílio de paquímetro digital,
196 expressando-se os valores em termos absolutos (cm) e de maneira alométrica, em valores
197 relativos (cm/kg PV).

198 Também foram registradas as medidas de volume do membro posterior direito dos
199 animais, utilizando-se uma proveta graduada com capacidade de 250 mL, que foi
200 preenchida com água até a superfície (V1). Em seguida, o membro foi submerso até a
201 altura da articulação tarso-tíbia (jarrete), sendo retirado suavemente e mensurado o
202 volume de água restante na proveta (V2). Assim, o volume do membro foi calculado
203 como: Volume (mL) = V1 - V2, sendo expresso em termos absolutos (mL) e de maneira
204 alométrica, em valores relativos (mL/kg Peso Vivo).

205 A temperatura superficial do membro posterior direito dos animais foi registrada
206 por meio de um equipamento Termovisor Fluke[®] (Modelo Ti-110), com termômetro
207 infravermelho acoplado. Foram obtidas 2 imagens por animal a cada dia de avaliação,
208 sendo que as imagens termográficas foram posteriormente analisadas por meio do
209 software SmartView[®], em que foram tomadas as medidas de temperatura de 10 pontos
210 em cada membro e calculadas as médias de temperatura superficial, expressas em °C, para
211 posteriores análises estatísticas.

212

213 *Abate, coleta de sangue, fígado e líquido sinovial*

214

215 Aos 36 dias de idade (15 dias após o desmame), os animais foram submetidos a
216 jejum de 6 horas e eutanasiados, para coleta de sangue e fígado. Após contenção dos
217 animais, foram aplicados os tranquilizantes tiopentol (120 mg/kg de peso vivo) e
218 lidocaína (10 mg/kg de peso vivo) via intraperitoneal e quando constatada a completa
219 insensibilização, os animais foram abatidos por sangria na veia jugular.

220 As amostras de sangue foram colhidas por ocasião do abate por punção na veia
221 jugular (Cai, Zimmerman & Ewan, 1994) e transferidas para tubos contendo EDTA,
222 sendo posteriormente centrifugadas a 3.000 rpm, por 15 minutos, para separação do soro
223 e do plasma (Moreno et al., 1997). Em seguida, 3 mL de plasma e 3 mL de soro foram
224 transferidos para tubos de polipropileno devidamente identificados e armazenados em
225 nitrogênio líquido, para posterior acondicionamento em ultra-freezer (-80°C).

226 Após o abate dos animais, o fígado foi imediatamente coletado, por meio de incisão
227 na cavidade abdominal, para a retirada de um segmento (cerca de 10 g), o qual foi
228 rapidamente pesado, para determinação do peso relativo, clampeado e mantido em
229 nitrogênio líquido, até o transporte para acondicionamento em ultra-freezer (-80°C) para
230 análises posteriores.

231 Por fim, a cavidade sinovial da articulação tarso-falange do membro posterior
232 direito foi aberta e 5 µL de fluido sinovial foram coletados para a preparação do esfregaço
233 e avaliação da infiltração de leucócitos no líquido sinovial.

234

235 *Avaliações de estresse oxidativo*

236

237 No plasma foram determinados os seguintes parâmetros de estado oxidativo:
238 glutathiona reduzida (GSH), capacidade antioxidante total (TAC), tióis e proteínas
239 carboniladas. No fígado, foram determinados os seguintes parâmetros de estado
240 oxidativo: catalase, superóxido dismutase e proteínas carboniladas. Todas as análises
241 foram realizadas no Laboratório de Metabolismo Hepático, do Departamento de
242 Bioquímica da UEM.

243 A GSH foi determinada em lisados de hemácias, utilizando kit comercial
244 (OxiSelect™ Total Glutathione (GSSG/GSH) Assay Kit, CAT-312, Cellbiolabs Inc.) por
245 meio do ensaio enzimático com a enzima glutathiona redutase, na presença de
246 nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Posteriormente, um cromógeno
247 presente no kit comercial foi adicionado para reagir com grupo tiol da GSH, que
248 foi lido em espectrofotômetro, a 405nm. Os procedimentos de cálculo para as
249 concentrações de GSH foram realizados conforme descritos no kit comercial.

250 A TAC foi determinada pelo método colorimétrico, utilizando o composto 2,2'-
251 azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ou ABTS, descrito por Erel (2004). Os
252 resultados foram expressos em mmol equivalente TROLOX.mg de proteína⁻¹.

253 Os níveis plasmáticos de tióis totais foram determinados utilizando o DTNB (ácido
254 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico), conforme descrito por Faure e Lafond (1995). A diferença
255 de absorvância inicial e final foi utilizada para calcular a concentração de tióis reduzidos
256 e os valores foram expressos como nmol de tióis.mg de proteína⁻¹.

257 O conteúdo de proteínas carboniladas, tanto para plasma quanto para fígado, foi
258 determinado pelo método do 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), como descrito por Levine
259 *et al.* (1990). O conteúdo de proteínas carboniladas foi calculado com base no coeficiente

260 de extinção molar de $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e os resultados foram expressos em nmol de
261 grupamentos carbonil.mg de proteína⁻¹. O conteúdo proteico (proteínas totais, albumina
262 e globulinas) foi determinado conforme descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando
263 albumina bovina como padrão.

264 O fígado, ainda congelado, foi pesado e homogeneizado em homogeneizador do
265 tipo Van Potter Elvhjem com dez volumes de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4)
266 para o preparo do homogenato hepático. Para as determinações das atividades das
267 enzimas antioxidantes: catalase, superóxido dismutase, bem como o conteúdo de
268 proteínas carboniladas, foram utilizados os sobrenadantes obtidos após a centrifugação
269 dos respectivos homogenatos a 5.000 rpm por 15 minutos. O conteúdo proteico dos
270 homogenatos de fígado e dos sobrenadantes após centrifugação foram determinados
271 como descrito por Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina como padrão.

272 A atividade da enzima catalase foi avaliada pela decomposição enzimática do H₂O₂
273 medida diretamente por espectrofotometria em 240 nm, conforme descrito por Aebi
274 (1974). A atividade da enzima SOD foi determinada por meio da capacidade desta enzima
275 em inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol em meio alcalino, que pode ser
276 monitorado por espectrofotometria em 420 nm (Marklund & Marklund, 1974).

277

278 *Proteínas de fase aguda*

279

280 A determinação das frações séricas de proteínas totais, albumina, globulinas e
281 proteínas de fase aguda foi conduzida no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade
282 de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita
283 Filho”, em Jaboticabal-SP.

284 No soro sanguíneo, as proteínas de fase aguda (IgG, IgA, ceruloplasmina,
285 glicoproteína ácida, haptoglobina e transferrina) foram quantificadas por eletroforese.
286 Uma amostra do soro foi submetida a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida
287 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram determinadas as frações da
288 proteína por densitometria computadorizada, usando-se como referência um marcador
289 com pesos moleculares de 29 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 116 kDa, 205 kDa. As concentrações
290 das proteínas de fase aguda foram determinadas pela proporção das mesmas em relação
291 aos valores da proteína total (Laemmli, 1970).

292

293 *Infiltração de leucócitos no líquido sinovial*

294 O esfregaço foi corado pelo corante May-Grunwald-Giemsa e utilizado para a
295 contagem diferencial de leucócitos (células mononucleares e polimorfonucleares) em um
296 microscópio óptico (Motic®, ds 300, Xiemen, China), com aumento de 100 x.
297 Imediatamente após a coleta do fluído sinovial puro, foi realizada uma lavagem da
298 cavidade articular com 100 µL de solução fisiológica 0,9% contendo anticoagulante
299 EDTA (5%), e diluído numa solução de Turk (1:20) por cinco minutos. Uma amostra
300 deste lavado foi utilizada para a contagem total de leucócitos com auxílio de um
301 hemocítmetro (câmara de Neubauer), conforme metodologia proposta por Bressan,
302 Cunha e Tonussi (2006). Para todas as mensurações, os resultados foram expressos em
303 células x 10³ / µL.

304

305 *Análise estatística*

306

307 O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para avaliar a presença de *outliers*
308 entre as variáveis obtidas. A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de
309 variâncias entre os tratamentos para as diversas variáveis foram avaliadas previamente
310 utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente, por meio do
311 software “*Statistical Analysis System*” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA, 2010).

312 A análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio do procedimento “*General*
313 *Linear Models*” (GLM) do software estatístico SAS (2010). Foi aplicado o Teste de SNK
314 para comparação das médias obtidas entre os protocolos de um mesmo grupo e o teste F
315 entre os grupos de um mesmo protocolo. Os graus de liberdade referentes aos dias de
316 avaliação pós-desmame foram desdobrados em polinômios ortogonais, para obtenção das
317 equações de regressão, conforme o melhor ajustamento. Para todas as análises, foi
318 adotado o nível de significância (P) de 0,05.

319

320

321 **3. Resultados**

322

323 *Peso vivo, temperatura superficial e avaliações morfológicas*

324

325 Os valores médios de peso vivo (kg) de fêmeas suínas recém desmamadas com
326 artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento (Tabela 2) não diferiram entre os
327 protocolos (P>0,05), tanto para o grupo positivo quanto para o controle, em todos os dias

328 de avaliação. Ainda assim, houve diferenças entre os grupos positivo e controle, dentro
 329 de cada protocolo, cujos menores valores de peso vivo foram observados nos animais
 330 com artrite induzida (Figura 1-A).

331 Pela análise de regressão, houve efeito quadrático dos protocolos sobre o peso vivo,
 332 em que os menores valores foram observados no dia 6, para todos os protocolos, dentro
 333 dos dois grupos avaliados (Figura 1-B). O peso vivo foi sempre menor para os protocolos
 334 do grupo positivo.

335 Os valores médios de temperatura superficial (°C) de fêmeas suínas recém
 336 desmamadas com artrite induzida por adjuvante (Tabela 2) foram similares entre os
 337 protocolos ($P>0,05$) no grupo positivo. No grupo controle a única diferença ($P<0,05$)
 338 ocorreu no protocolo II, no dia da desmama (dia 0), que foi diferente dos demais
 339 protocolos. Para os demais dias de avaliação (3, 6, 9, 12 e 15), não houve diferenças
 340 ($P>0,05$) entre os protocolos. Ainda assim, houve diferenças entre os grupos positivo e
 341 controle, dentro de cada protocolo, em que os maiores valores de temperatura superficial
 342 foram observados nos animais com artrite induzida (Figura 2-A). Ao analisar os valores
 343 médios de temperatura superficial ao longo dos dias de avaliação, houve redução linear
 344 para todos os protocolos, dentro de cada grupo (Figura 2-B).

345 Não houve diferenças ($P>0,05$) entre as médias de perímetro (cm/kg) da articulação
 346 tarso-falange direita de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de
 347 lactação em diferentes grupos e protocolos de indução (Tabela 2), em todos os dias de
 348 avaliação pós-desmame (0 a 15). Porém, houve diferenças ($P<0,05$) entre os grupos
 349 positivo e controle, dentro de cada protocolo, em que os maiores valores foram
 350 observados nos animais com artrite induzida (Figura 3-A). Ao longo dos 15 dias de
 351 avaliação pós-desmame, houve comportamento quadrático ($P<0,05$) dos valores médios
 352 de perímetro da articulação para ambos os grupos, com estimativas de 6,36 e 7,15 dias
 353 para grupo positivo e controle, respectivamente (Figura 3-B).

354

355 **Tabela 2.** Peso vivo, temperatura superficial e parâmetros morfológicos da articulação
 356 tarso-falange direita de fêmeas suínas, após o desmame com artrite induzida por adjuvante
 357 na fase de aleitamento.

Variáveis	Protocolos de Indução								EPM ³
	Grupo Positivo ¹				Grupo Controle ²				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
	Desmame (dia 0)								
Peso vivo (kg) ^{4,5}	5,71 ^{aB}	5,60 ^{aB}	5,73 ^{aB}	5,84 ^{aB}	7,86 ^{aA}	7,78 ^{aA}	7,81 ^{aA}	7,59 ^{aA}	0,208
Temperatura (°C)	38,30 ^{aA}	37,24 ^{aA}	39,06 ^{aA}	38,93 ^{aA}	34,98 ^{aB}	32,54 ^{bbB}	36,47 ^{aB}	34,73 ^{aB}	0,411
Perímetro (cm/kg)	6,18 ^{aA}	5,98 ^{aA}	5,93 ^{aA}	6,04 ^{aA}	3,53 ^{aB}	3,64 ^{aB}	3,23 ^{aB}	3,44 ^{aB}	0,119

Diâmetro (cm/kg)	2,03 ^{aA}	1,92 ^{aA}	1,98 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,26 ^{aB}	1,31 ^{aB}	1,28 ^{aB}	1,23 ^{aB}	0,052
Volume (mL/kg)	5,61 ^{aA}	5,73 ^{aA}	5,68 ^{aA}	5,70 ^{aA}	4,16 ^{aB}	4,13 ^{aB}	4,26 ^{aB}	4,21 ^{aB}	0,233
3 dias pós-desmame									
Peso vivo (kg)	5,13 ^{aB}	4,98 ^{aB}	5,21 ^{aB}	5,06 ^{aB}	7,04 ^{aA}	7,11 ^{aA}	7,08 ^{aA}	6,93 ^{aA}	0,202
Temperatura (°C)	35,24 ^{aA}	35,83 ^{aA}	36,04 ^{aA}	34,83 ^{aA}	31,36 ^{aB}	30,14 ^{aB}	31,86 ^{aB}	30,55 ^{aB}	0,398
Perímetro (cm/kg)	6,22 ^{aA}	5,93 ^{aA}	5,94 ^{aA}	6,18 ^{aA}	3,81 ^{aB}	3,88 ^{aB}	3,76 ^{aB}	3,79 ^{aB}	0,133
Diâmetro (cm/kg)	2,11 ^{aA}	2,09 ^{aA}	2,06 ^{aA}	2,13 ^{aA}	1,46 ^{aB}	1,50 ^{aB}	1,48 ^{aB}	1,43 ^{aB}	0,064
Volume (mL/kg)	6,03 ^{aA}	6,11 ^{aA}	6,08 ^{aA}	6,23 ^{aA}	4,98 ^{aB}	4,91 ^{aB}	5,03 ^{aB}	5,01 ^{aB}	0,254
6 dias pós-desmame									
Peso vivo (kg)	4,83 ^{aB}	4,51 ^{bB}	5,03 ^{aB}	4,76 ^{bB}	6,71 ^{aA}	6,82 ^{aA}	6,75 ^{aA}	6,58 ^{aA}	0,197
Temperatura (°C)	32,04 ^{aA}	33,22 ^{aA}	31,32 ^{aA}	32,15 ^{aA}	28,18 ^{aB}	28,54 ^{aB}	29,16 ^{aB}	28,95 ^{aB}	0,365
Perímetro (cm/kg)	6,48 ^{aA}	6,14 ^{aA}	6,14 ^{aA}	6,26 ^{aA}	4,13 ^{aB}	4,04 ^{aB}	4,13 ^{aB}	4,24 ^{aB}	0,151
Diâmetro (cm/kg)	2,17 ^{aA}	2,10 ^{aA}	2,08 ^{aA}	2,09 ^{aA}	1,49 ^{aB}	1,48 ^{aB}	1,56 ^{aB}	1,44 ^{aB}	0,071
Volume (mL/kg)	6,98 ^{aA}	6,41 ^{aA}	6,77 ^{aA}	6,81 ^{aA}	5,67 ^{aB}	5,76 ^{aA}	5,80 ^{aB}	5,77 ^{aB}	0,283
9 dias pós-desmame									
Peso vivo (kg)	5,28 ^{aB}	5,31 ^{aB}	5,14 ^{aB}	5,02 ^{aB}	7,12 ^{aA}	7,28 ^{aA}	7,26 ^{aA}	7,08 ^{aA}	0,204
Temperatura (°C)	32,89 ^{aA}	33,01 ^{aA}	30,12 ^{aA}	31,23 ^{aA}	28,08 ^{aB}	29,13 ^{aB}	29,17 ^{aB}	28,24 ^{aB}	0,353
Perímetro (cm/kg)	6,01 ^{aA}	5,88 ^{aA}	5,16 ^{aA}	5,13 ^{aA}	3,71 ^{aB}	3,84 ^{aB}	3,79 ^{aB}	3,91 ^{aB}	0,144
Diâmetro (cm/kg)	1,96 ^{aA}	1,98 ^{aA}	1,93 ^{aA}	1,95 ^{aA}	1,45 ^{aB}	1,45 ^{aB}	1,52 ^{aB}	1,46 ^{aB}	0,069
Volume (mL/kg)	7,83 ^{aA}	7,64 ^{aA}	7,77 ^{aA}	7,72 ^{aA}	6,13 ^{aB}	6,21 ^{aB}	6,26 ^{aB}	6,30 ^{aB}	0,313
12 dias pós-desmame									
Peso vivo (kg)	5,73 ^{aB}	5,62 ^{aB}	5,41 ^{aB}	5,33 ^{aB}	8,03 ^{aA}	8,18 ^{aA}	7,98 ^{aA}	8,23 ^{aA}	0,211
Temperatura (°C)	33,98 ^{aA}	32,77 ^{aA}	33,11 ^{aA}	30,08 ^{aA}	26,87 ^{aB}	27,74 ^{aB}	27,16 ^{aB}	26,12 ^{aB}	0,341
Perímetro (cm/kg)	5,51 ^{aA}	5,12 ^{aA}	5,24 ^{aA}	5,04 ^{aA}	3,53 ^{aB}	3,60 ^{aB}	3,51 ^{aB}	3,47 ^{aB}	0,123
Diâmetro (cm/kg)	1,83 ^{aA}	1,79 ^{aA}	1,76 ^{aA}	1,81 ^{aA}	1,42 ^{aB}	1,46 ^{aB}	1,48 ^{aB}	1,42 ^{aB}	0,050
Volume (mL/kg)	9,09 ^{aA}	8,63 ^{aA}	8,88 ^{aA}	9,02 ^{aA}	6,96 ^{aB}	7,03 ^{aB}	7,06 ^{aB}	6,98 ^{aB}	0,342
15 dias pós-desmame									
Peso vivo (kg)	6,03 ^{aB}	5,88 ^{aB}	5,93 ^{aB}	5,95 ^{aB}	9,84 ^{aA}	9,78 ^{aA}	9,36 ^{aA}	9,87 ^{aA}	0,224
Temperatura (°C)	30,54 ^{aA}	29,14 ^{aA}	30,21 ^{aA}	29,20 ^{aA}	26,44 ^{aB}	27,02 ^{aB}	26,18 ^{aB}	27,45 ^{aB}	0,322
Perímetro (cm/kg)	4,94 ^{aA}	4,92 ^{aA}	5,03 ^{aA}	4,83 ^{aA}	3,21 ^{aB}	3,24 ^{aB}	3,26 ^{aB}	3,20 ^{aB}	0,115
Diâmetro (cm/kg)	1,68 ^{aA}	1,60 ^{aA}	1,56 ^{aA}	1,62 ^{aA}	1,36 ^{aB}	1,40 ^{aB}	1,38 ^{aB}	1,37 ^{aB}	0,048
Volume (mL/kg)	10,13 ^{aA}	9,88 ^{aA}	10,04 ^{aA}	9,93 ^{aA}	7,46 ^{aB}	7,53 ^{aB}	7,61 ^{aB}	7,58 ^{aB}	0,361
P-valor - Regressão									
Peso vivo	0,003	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-
Temperatura	0,011	0,004	0,0012	0,006	0,005	0,004	0,005	0,006	-
Perímetro	<0,001	<0,001	0,005	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-
Diâmetro	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,008	<0,001	<0,001	-
Volume	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-

358 1- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
359 (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

360 2- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
361 (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

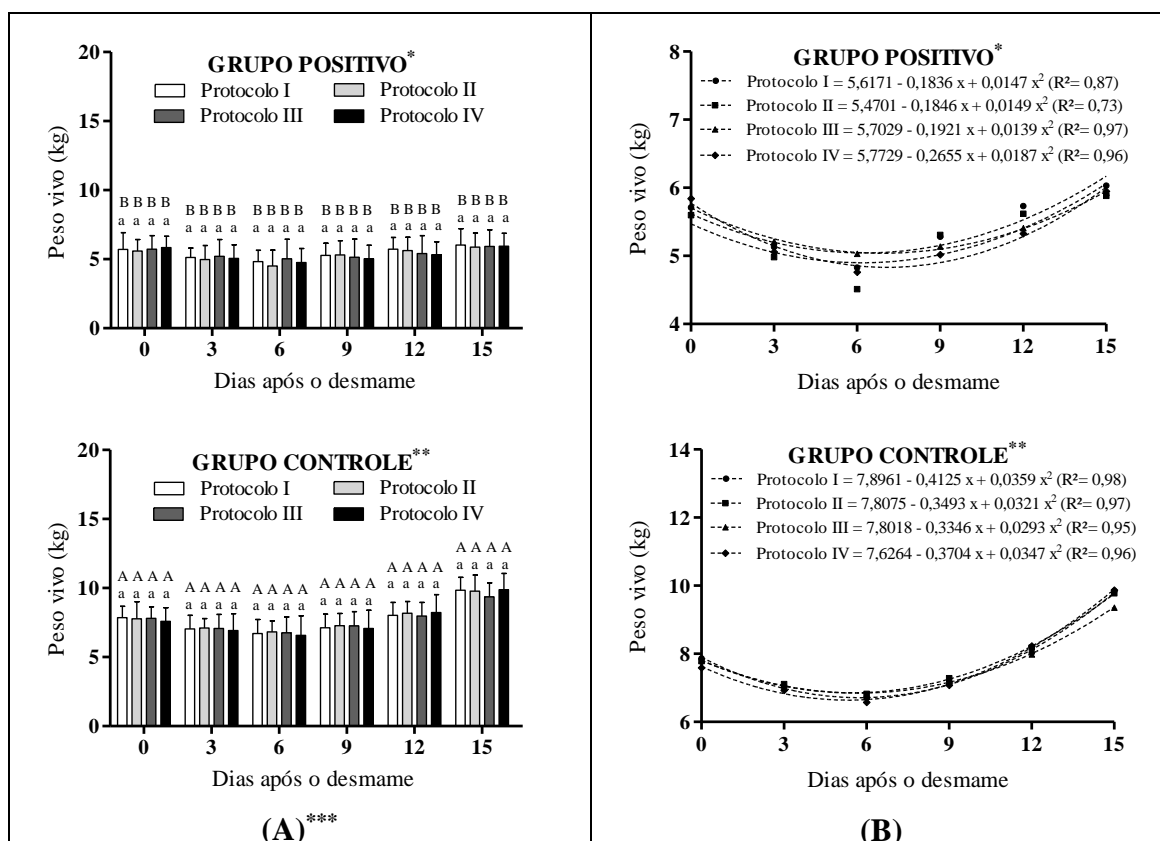
362 3- Erro padrão da média.

363 4- Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias pelo teste de
364 SNK (P<0,05).

365 5- Letras maiúsculas diferentes entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre as médias pelo teste F
366 (P<0,05).

367

368



369 **Figura 1.** Peso corporal de fêmeas suínas após o desmame, submetidas a diferentes
 370 protocolos de artrite induzida por adjuvante, na fase de aleitamento (A: teste de médias
 371 para grupos e protocolos de indução; B: análise de regressão em função do tempo após o
 372 desmame).

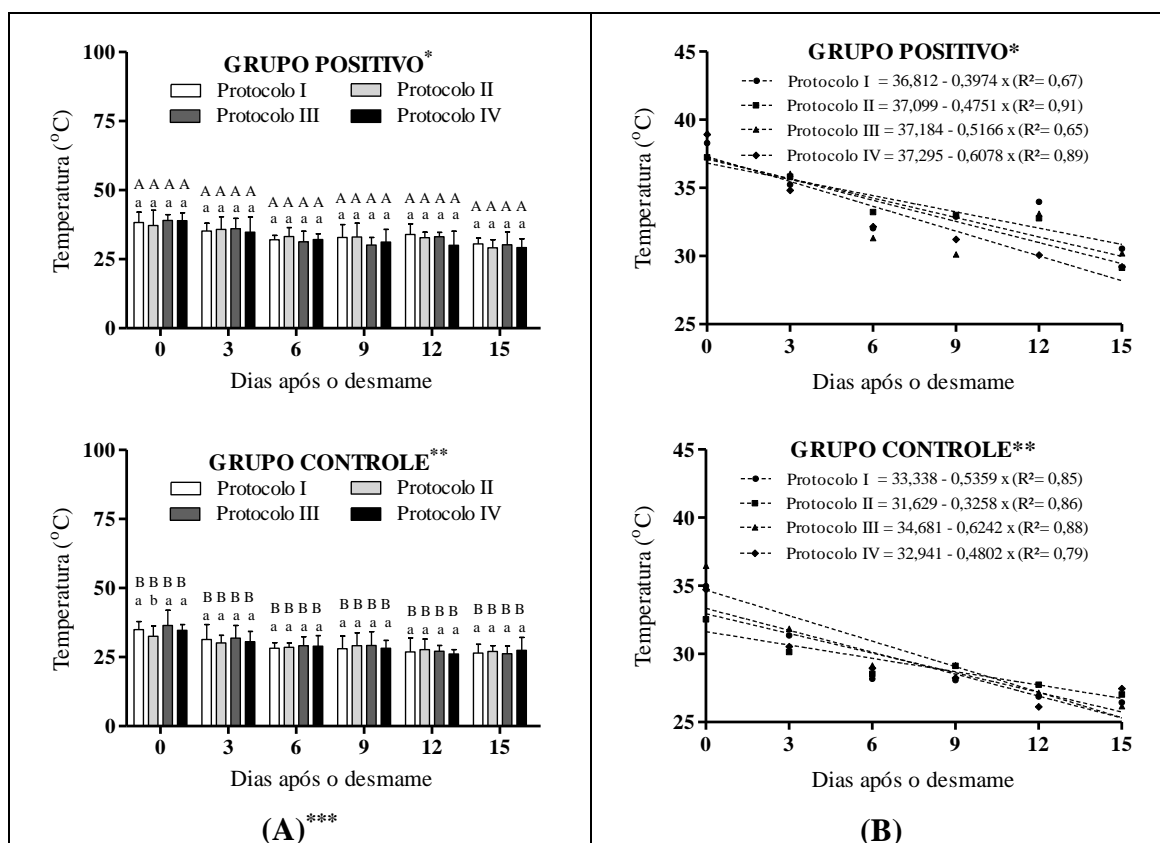
373 * Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 374 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 375 (Protocolo IV).

376 ** Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 377 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 378 (Protocolo IV).

379 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
 380 SNK ($P<0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupo, pelo
 381 teste F ($P<0,05$).

382

383



384 **Figura 2.** Temperatura Superficial da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas
 385 após o desmame, submetidas a diferentes protocolos de artrite induzida por adjuvante, na
 386 fase de aleitamento (A: teste de médias para grupos e protocolos de indução; B: análise
 387 de regressão em função do tempo após o desmame).

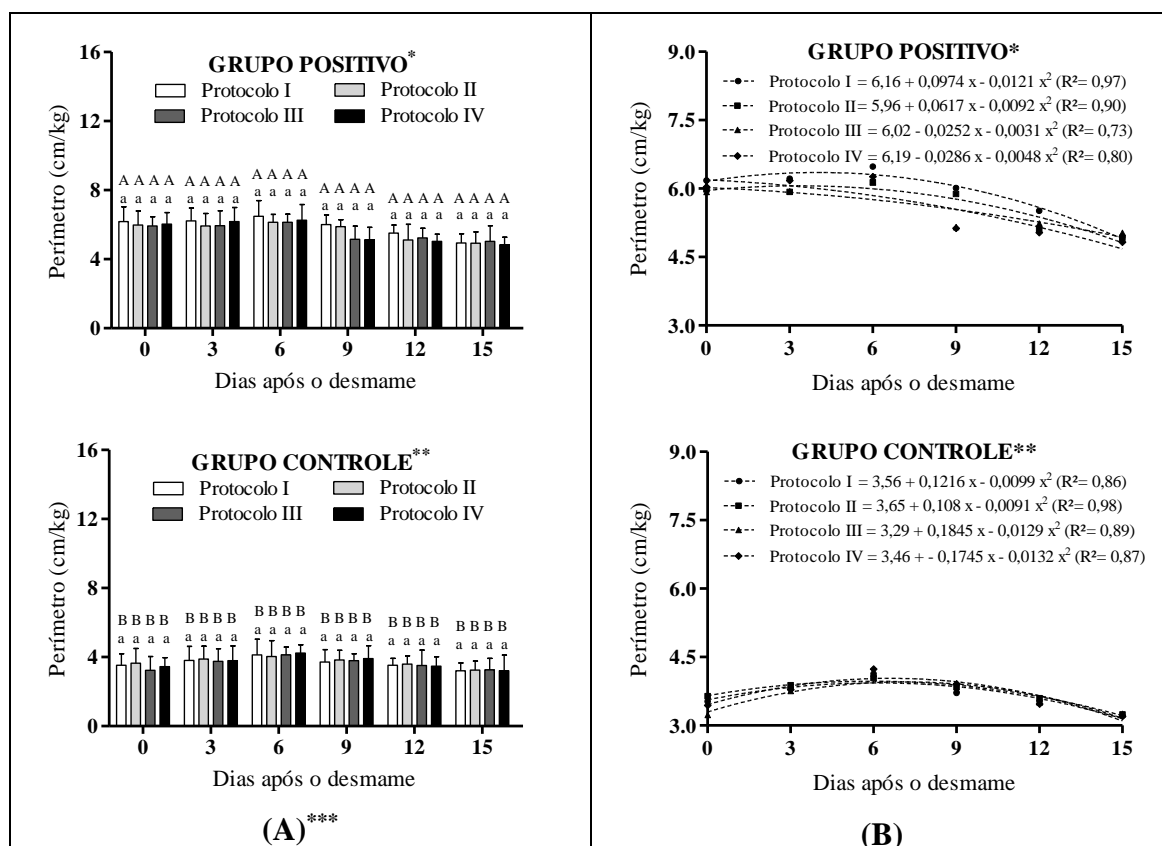
388 * Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 389 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 390 (Protocolo IV).

391 ** Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 392 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 393 (Protocolo IV).

394 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
 395 SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupo, pelo
 396 teste F ($P < 0,05$).

397

398



399 **Figura 3.** Perímetro da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas após o
 400 desmame, submetidas a diferentes protocolos de artrite induzida por adjuvante, na fase
 401 de aleitamento (A: teste de médias para grupos e protocolos de indução; B: análise de
 402 regressão em função do tempo após o desmame).

403 *Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 404 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 405 (Protocolo IV).

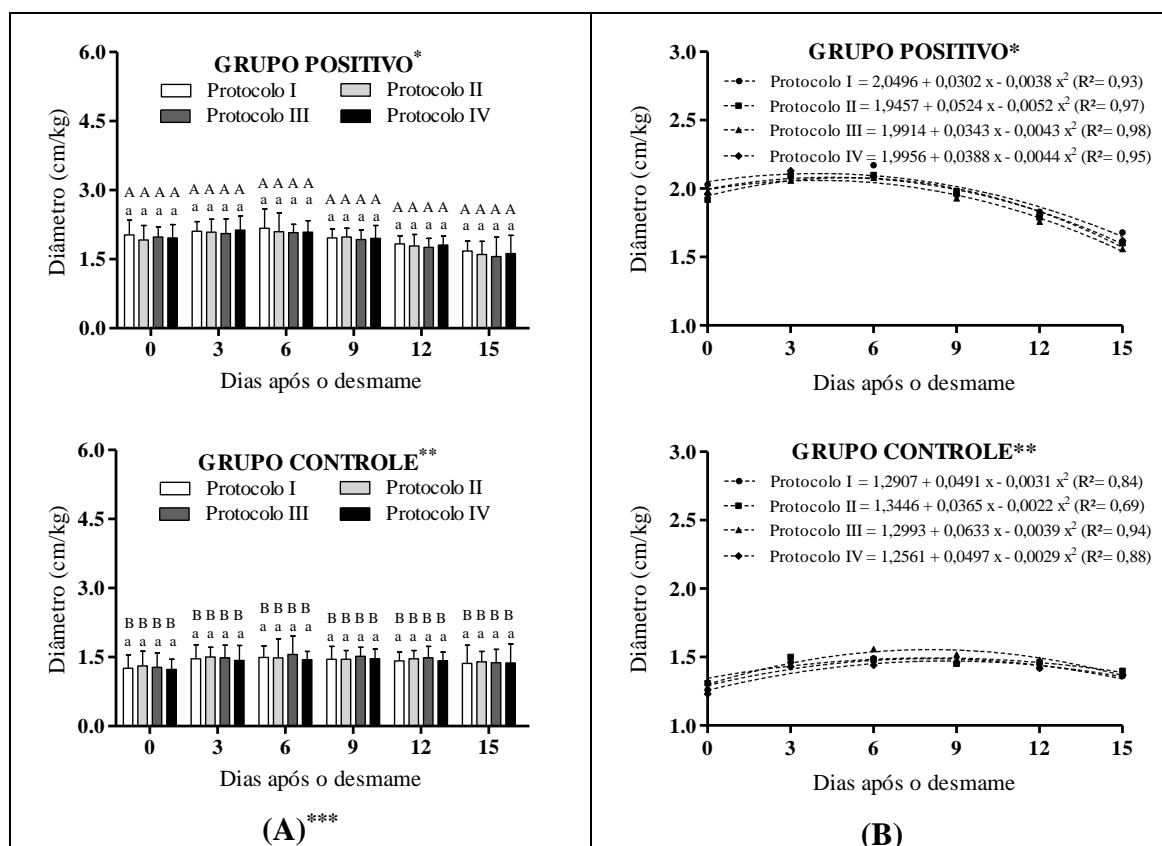
406 **Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 407 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 408 (Protocolo IV).

409 ***Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
 410 SNK ($P<0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupo, pelo
 411 teste F ($P<0,05$).

412

413 Não houve diferenças ($P>0,05$) no diâmetro (cm/kg) da articulação tarso-falange
 414 direita de fêmeas suínas entre os dois grupos e nem entre os protocolos de indução (Tabela
 415 2), em todos os dias de avaliação. Porém, houve diferenças ($P<0,05$) entre os grupos
 416 positivo e controle, dentro de cada protocolo, para todos os dias de avaliação, em que os
 417 maiores valores foram observados nos animais com artrite induzida (Figura 4-A). A
 418 análise de regressão revelou efeito quadrático ($P<0,05$) dos dias de avaliação sobre o
 419 diâmetro da articulação em ambos os grupos, em que os maiores valores foram
 420 observados nos dias 5,04 e 8,57, para o grupo positivo e controle, respectivamente (Figura
 421 4-B).

422



423 **Figura 4.** Diâmetro da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas após o desmame,
424 submetidas a diferentes protocolos de artrite induzida por adjuvante, na fase de
425 aleitamento (A: teste de médias para grupos e protocolos de indução; B: análise de
426 regressão em função do tempo após o desmame).

427 * Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
428 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
429 (Protocolo IV).

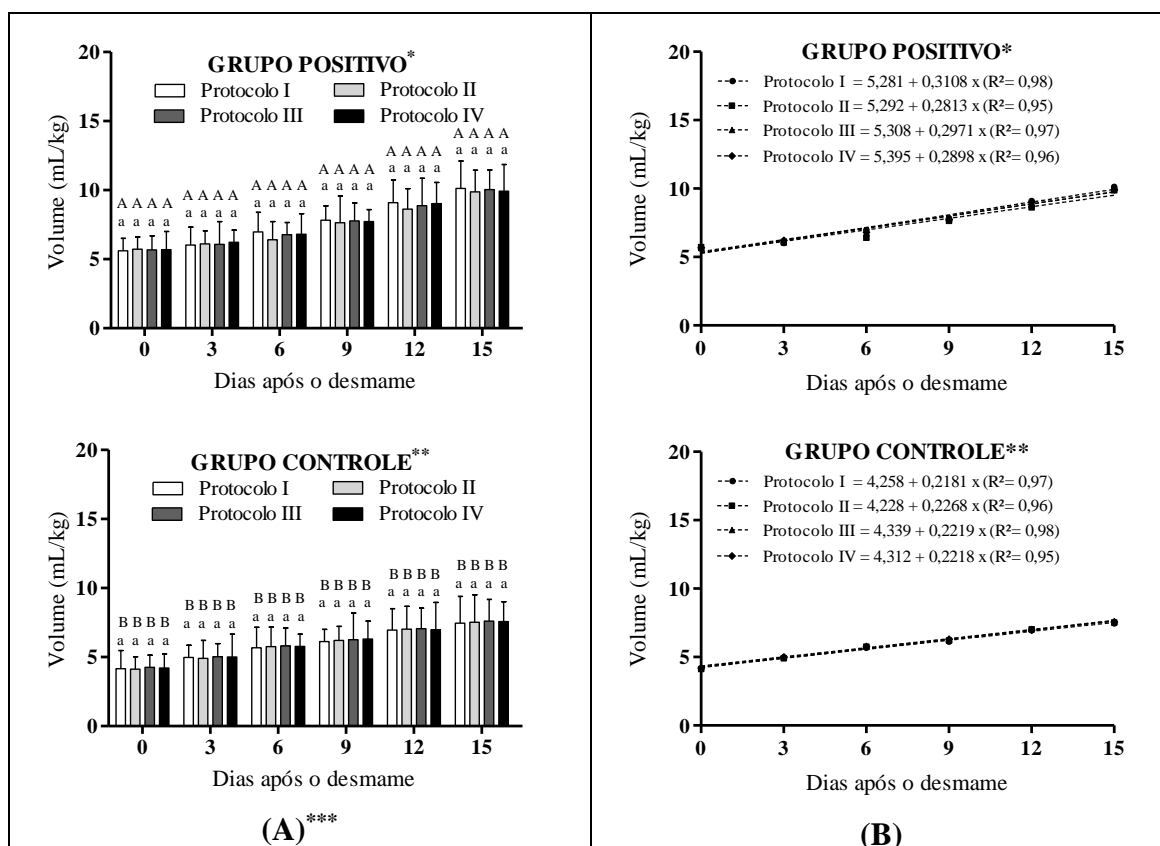
430 ** Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
431 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
432 (Protocolo IV).

433 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
434 SNK ($P<0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupos,
435 pelo teste F ($P<0,05$).

436

437 Não houve diferenças ($P>0,05$) no volume (mL/kg) da articulação tarso-falange
438 direita de fêmeas suínas (Tabela 2), em todos os dias de avaliação pós-desmame. Porém,
439 houve diferenças ($P<0,05$) entre os grupos positivo e controle, dentro de cada protocolo,
440 para todos os dias de avaliação, em que os maiores valores foram observados nos animais
441 com artrite induzida (Figura 5-A). Ao longo dos 15 dias de avaliação pós-desmame,
442 houve comportamento linear crescente ($P<0,05$) dos valores médios de volume da
443 articulação para ambos os grupos, em que os maiores valores foram estimados para os
444 protocolos do grupo positivo (Figura 5-B).

445



446 **Figura 5.** Volume da articulação tarso-falange direita de fêmeas suínas após o desmame,
 447 submetidas a diferentes protocolos de artrite induzida por adjuvante, na fase de
 448 aleitamento (A: teste de médias para grupos e protocolos de indução; B: análise de
 449 regressão em função do tempo após o desmame).

450 * Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 451 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 452 (Protocolo IV).

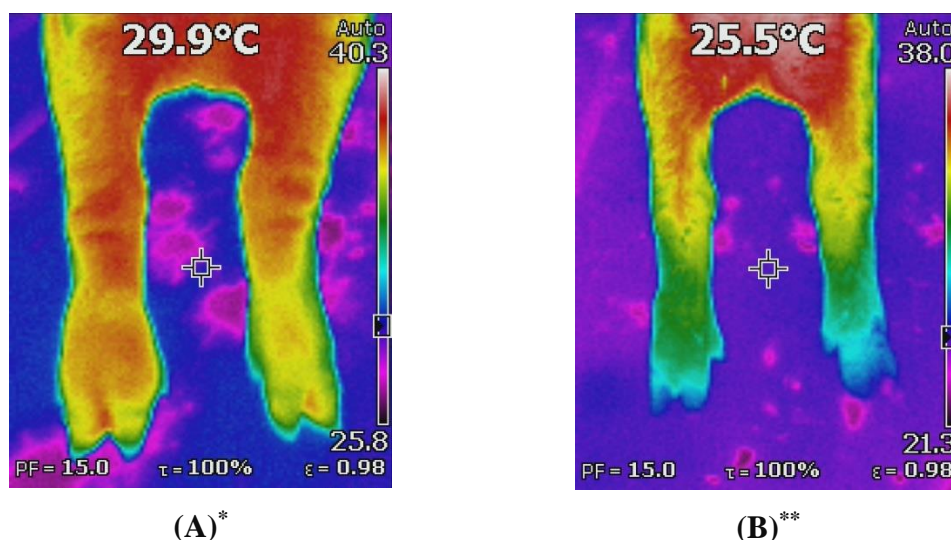
453 ** Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 454 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 455 (Protocolo IV).

456 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
 457 SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupos,
 458 pelo teste F ($P < 0,05$).

459

460 As imagens registradas por meio da câmera termográfica forneceram com nitidez
 461 as diferenças de temperatura entre as articulações dos animais dos grupos positivo e
 462 controle. Na Figura 6, com imagens de animais do protocolo I, é possível verificar
 463 diferença de temperatura de 4,4 °C entre os grupos.

464



465 **Figura 6.** Imagens termográficas dos membros posteriores de uma fêmea suína desmamada
 466 (21 dias de idade) do grupo positivo (A) e de outra do grupo controle (B).

467 *Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita, aos
 468 7 dias de idade (Protocolo I).

469 **Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
 470 de idade (Protocolo I).

471

472 *Avaliações de estresse oxidativo*

473

474 Todas as variáveis do estado oxidativo no plasma diferiram ($P < 0,05$) entre os
 475 grupos positivo e controle, no entanto, as médias foram similares ($P > 0,05$) entre os
 476 protocolos, dentro de cada grupo (Tabela 3).

477

478 **Tabela 3.** Estado oxidativo no plasma de fêmeas suínas no 15º dia após o desmame, com
 479 artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento, em diferentes grupos e protocolos de
 480 indução.

Variáveis ¹	Protocolos de Indução								EPM ⁴
	Grupo Positivo ²				Grupo Controle ³				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
GSH (nmol/mg proteína) ^{5,6}	12,06 ^{aB}	12,22 ^{aB}	11,36 ^{aB}	11,65 ^{aB}	15,19 ^{aA}	15,39 ^{aA}	15,95 ^{aA}	15,37 ^{aA}	0,734
TAC (mmol equivalente TROLOX/mL plasma)	9,41 ^{aB}	10,19 ^{aB}	10,04 ^{aB}	10,20 ^{aB}	12,69 ^{aA}	12,31 ^{aA}	12,33 ^{aA}	12,69 ^{aA}	0,583
Tióis (nmol/mg proteína)	294,8 ^{aB}	317,6 ^{aB}	315,7 ^{aB}	293,5 ^{aB}	487,2 ^{aA}	445,5 ^{aA}	488,3 ^{aA}	433,6 ^{aA}	53,85
Proteínas carboniladas (nmol/mg proteína)	6,60 ^{aB}	6,02 ^{aA}	6,20 ^{aA}	6,15 ^{aA}	5,12 ^{aB}	5,32 ^{aB}	5,24 ^{aB}	5,26 ^{aB}	0,233

481 1- GSH: glutationa reduzida; TAC: capacidade antioxidante total.

482 2- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
 483 (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

484 3- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias (Protocolo
 485 I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

486 4- Erro padrão da média.

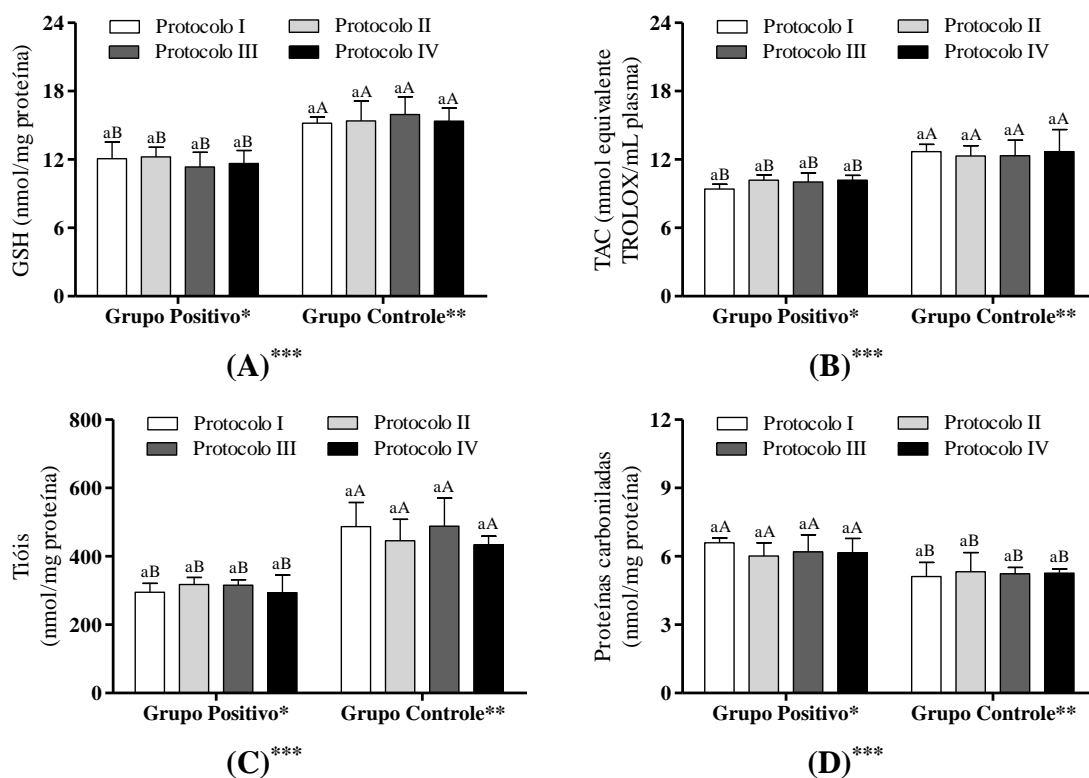
487 5- Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias pelo teste de
 488 SNK ($P < 0,05$).

489 6- Letras maiúsculas diferentes entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre as médias pelo teste F
 490 ($P < 0,05$).

491

492 De modo geral, para o grupo positivo, os valores de GSH, TAC e Tióis foram
 493 inferiores ($P < 0,05$) quando comparados aos valores do grupo controle, em todos os
 494 protocolos, conforme expresso nas figuras 7-A, 7-B e 7-C, respectivamente. O contrário
 495 ocorreu para as proteínas carboniladas, cujos valores foram superiores ($P < 0,05$) para os
 496 animais do grupo positivo (Figura 7-D).

497



498 **Figura 7.** Glutationa reduzida – GSH (A), Capacidade antioxidante total – TAC (B), Tióis
 499 (C) e Proteínas carboniladas (D) no plasma de fêmeas suínas no 15º dia pós desmame,
 500 com artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento em diferentes grupos e
 501 protocolos de indução.

502 *Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 503 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 504 (Protocolo IV).

505 **Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 506 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 507 (Protocolo IV).

508 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
 509 SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupos,
 510 pelo teste F ($P < 0,05$).

511

512 Com relação às variáveis hepáticas (Tabela 4), o peso relativo do fígado foi similar
 513 ($P > 0,05$) entre os grupos e entre os protocolos, conforme ilustrado na figura 8-A,
 514 enquanto as demais variáveis do estado oxidativo hepático diferiram ($P < 0,05$) entre os

515 grupos positivo e controle. Entre os protocolos, dentro de cada grupo, as médias foram
516 similares ($P > 0,05$).

517 **Tabela 4.** Peso relativo e variáveis de estado oxidativo no fígado de fêmeas suínas no
518 15º dia pós desmame, com artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento, em
519 diferentes grupos e protocolos de indução.

Variáveis	Protocolos de Indução								EPM ³
	Grupo Positivo ¹				Grupo Controle ²				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Fígado (% do PV) ^{4,5}	2,39 ^{aA}	2,74 ^{aA}	2,58 ^{aA}	2,86 ^{aA}	2,47 ^{aA}	2,77 ^{aA}	2,61 ^{aA}	2,51 ^{aA}	0,123
Catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	670,7 ^{aB}	622,6 ^{aB}	684,9 ^{aB}	637,6 ^{aB}	1005,7 ^{aA}	1060,3 ^{aA}	1113,8 ^{aA}	1156,2 ^{aA}	54,73
Superóxido dismutase (U/mg proteína)	1,49 ^{aB}	1,52 ^{aB}	1,78 ^{aB}	1,75 ^{aB}	2,45 ^{aA}	2,31 ^{aA}	2,25 ^{aA}	2,27 ^{aA}	0,145
Proteínas carboniladas (nmol/mg proteína)	7,22 ^{aA}	7,64 ^{aA}	7,38 ^{aA}	7,39 ^{aA}	6,09 ^{aB}	6,27 ^{aB}	5,86 ^{aB}	6,71 ^{aB}	0,323

520 1- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund[®] na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
521 (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

522 2- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias (Protocolo
523 I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

524 3- Erro padrão da média.

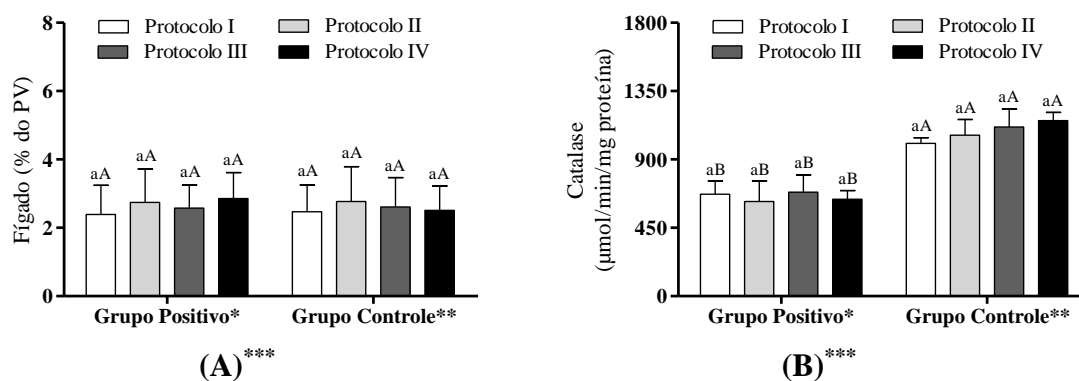
525 4- Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias pelo teste de
526 SNK ($P < 0,05$).

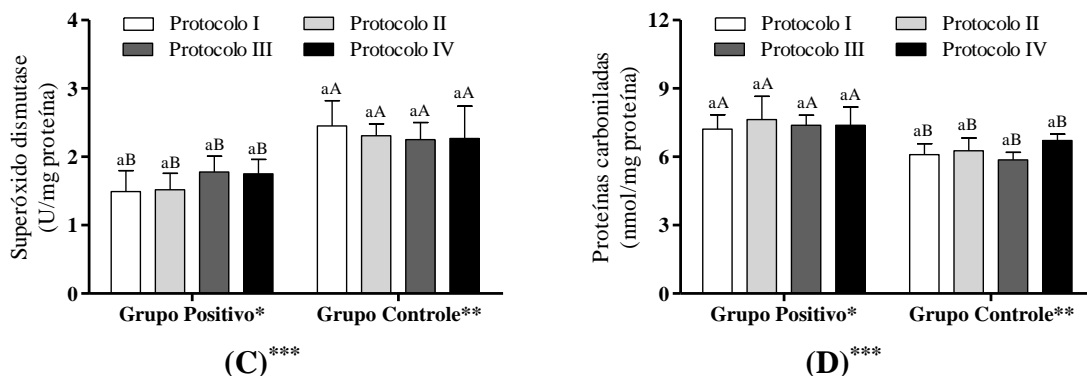
527 5- Letras maiúsculas diferentes entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre as médias pelo teste F
528 ($P < 0,05$).

529

530 A atividade da enzima catalase e concentração da superóxido dismutase foram
531 inferiores ($P < 0,05$) para os animais do grupo positivo, em todos os protocolos (Figuras 8-
532 B e 8-C). Já a concentração de proteínas carboniladas foi superior ($P < 0,05$) para os
533 animais do grupo positivo, conforme expresso na figura 8-D.

534





535 **Figura 8.** Peso relativo de fígado (A), Catalase (B), Superóxido dismutase (C) e Proteínas
 536 carboniladas (D) no tecido hepático de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante
 537 na fase de lactação, em diferentes grupos e protocolos de indução.

538 * Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 539 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 540 (Protocolo IV).

541 ** Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 542 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 543 (Protocolo IV).

544 *** Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias
 545 pelo teste de SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam
 546 diferença entre as médias pelo teste F ($P < 0,05$).

547

548 *Proteínas de fase aguda*

549

550 A concentração de proteínas totais, albumina, globulinas e a relação
 551 albumina:globulinas (Tabela 5) foi similar entre os protocolos de cada grupo ($P > 0,05$).

552 Ainda assim, as concentrações de proteínas totais, albumina e a relação
 553 albumina:globulinas foram inferiores para os protocolos do grupo positivo (Figuras 9-A,
 554 9-B e 9-D), enquanto a concentração de globulinas foi superior (Figura 9-C).

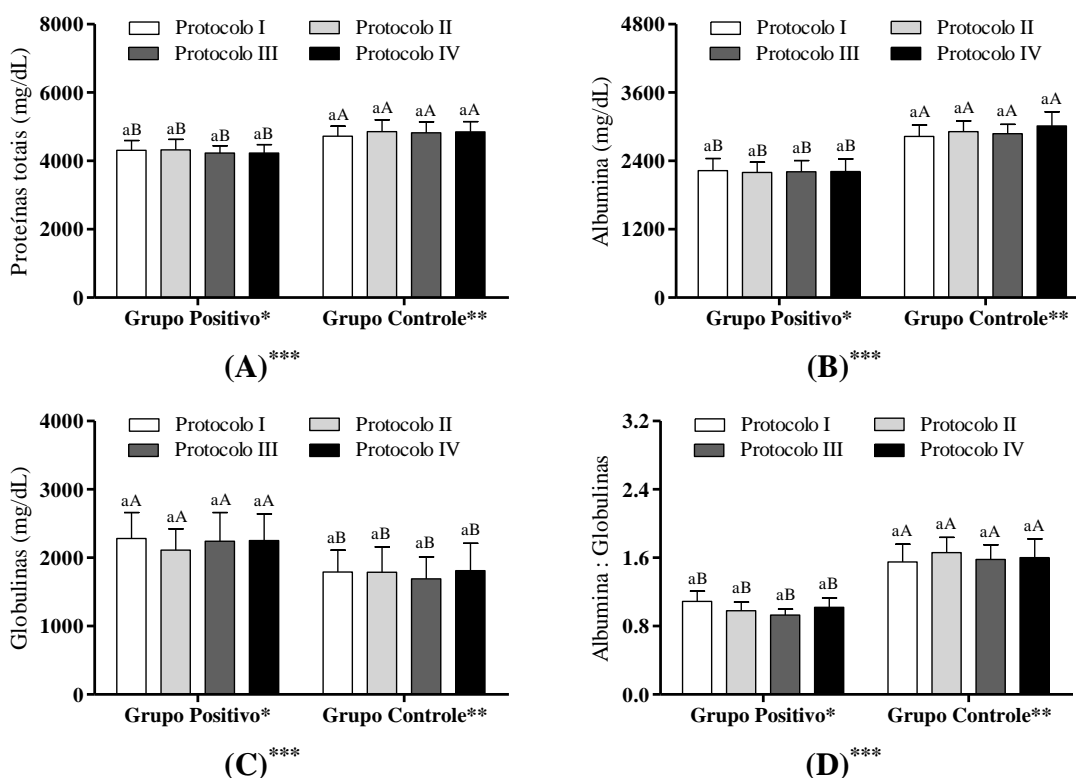
555

556 **Tabela 5.** Concentração de proteínas totais, albumina, globulinas e perfil de proteínas de
 557 fase aguda no soro de fêmeas suínas no 15º dia após o desmame, com artrite induzida por
 558 adjuvante na fase de aleitamento, em diferentes grupos e protocolos de indução.

Variáveis (mg/dL)	Protocolos de Indução								EPM ³
	Grupo Positivo ¹				Grupo Controle ²				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Proteínas totais ^{4,5}	4311 ^{aB}	4322 ^{aB}	4228 ^{aB}	4228 ^{aB}	4720 ^{aA}	4856 ^{aA}	4821 ^{aA}	4851 ^{aA}	364
Albumina	2230 ^{aB}	2196 ^{aB}	2209 ^{aB}	2215 ^{aB}	2831 ^{aA}	2913 ^{aA}	2878 ^{aA}	3012 ^{aA}	481
Globulinas	2283 ^{aA}	2112 ^{aA}	2241 ^{aA}	2253 ^{aA}	1792 ^{aB}	1789 ^{aB}	1691 ^{aB}	1811 ^{aB}	419
Albumina:Globulinas	1,09 ^{aB}	0,98 ^{aB}	0,93 ^{aB}	1,02 ^{aB}	1,55 ^{aA}	1,66 ^{aA}	1,58 ^{aA}	1,60 ^{aA}	0,48
Proteínas de fase aguda (mg/dL)									
IgA	81,12 ^{aA}	82,10 ^{aA}	70,16 ^{bB}	66,51 ^{bB}	70,25 ^{aB}	68,65 ^{aB}	71,10 ^{aB}	69,65 ^{aB}	7,69
IgG	546,94 ^{bB}	590,76 ^{bB}	702,89 ^{aA}	698,41 ^{aA}	709,58 ^{aA}	683,27 ^{aA}	705,51 ^{aA}	711,16 ^{aA}	22,58
Transferrina	401,18 ^{aB}	381,76 ^{aB}	395,14 ^{aB}	397,39 ^{aB}	537,75 ^{aA}	481,77 ^{aA}	470,63 ^{aA}	490,67 ^{aA}	13,89

Ceruloplasmina	60,62 ^{aA}	61,76 ^{aA}	63,87 ^{aA}	66,73 ^{aA}	50,92 ^{aB}	46,27 ^{Ab}	48,58 ^{aB}	47,67 ^{aB}	5,87
Haptoglobina	48,19 ^{aB}	44,64 ^{aB}	47,38 ^{aB}	44,39 ^{aB}	58,42 ^{aA}	56,27 ^{aA}	59,86 ^{aA}	56,71 ^{aA}	3,12
α 1-glicoproteína ácida	5,71 ^{aA}	5,64 ^{aA}	6,15 ^{aA}	6,11 ^{aA}	5,00 ^{aB}	4,68 ^{aB}	4,74 ^{aB}	4,89 ^{aB}	0,51

559 1- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
560 (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).
561 2- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias (Protocolo
562 I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).
563 3- Erro padrão da média.
564 4- Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias pelo teste de
565 SNK ($P < 0,05$).
566 5- Letras maiúsculas diferentes entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre as médias pelo teste F
567 ($P < 0,05$).
568



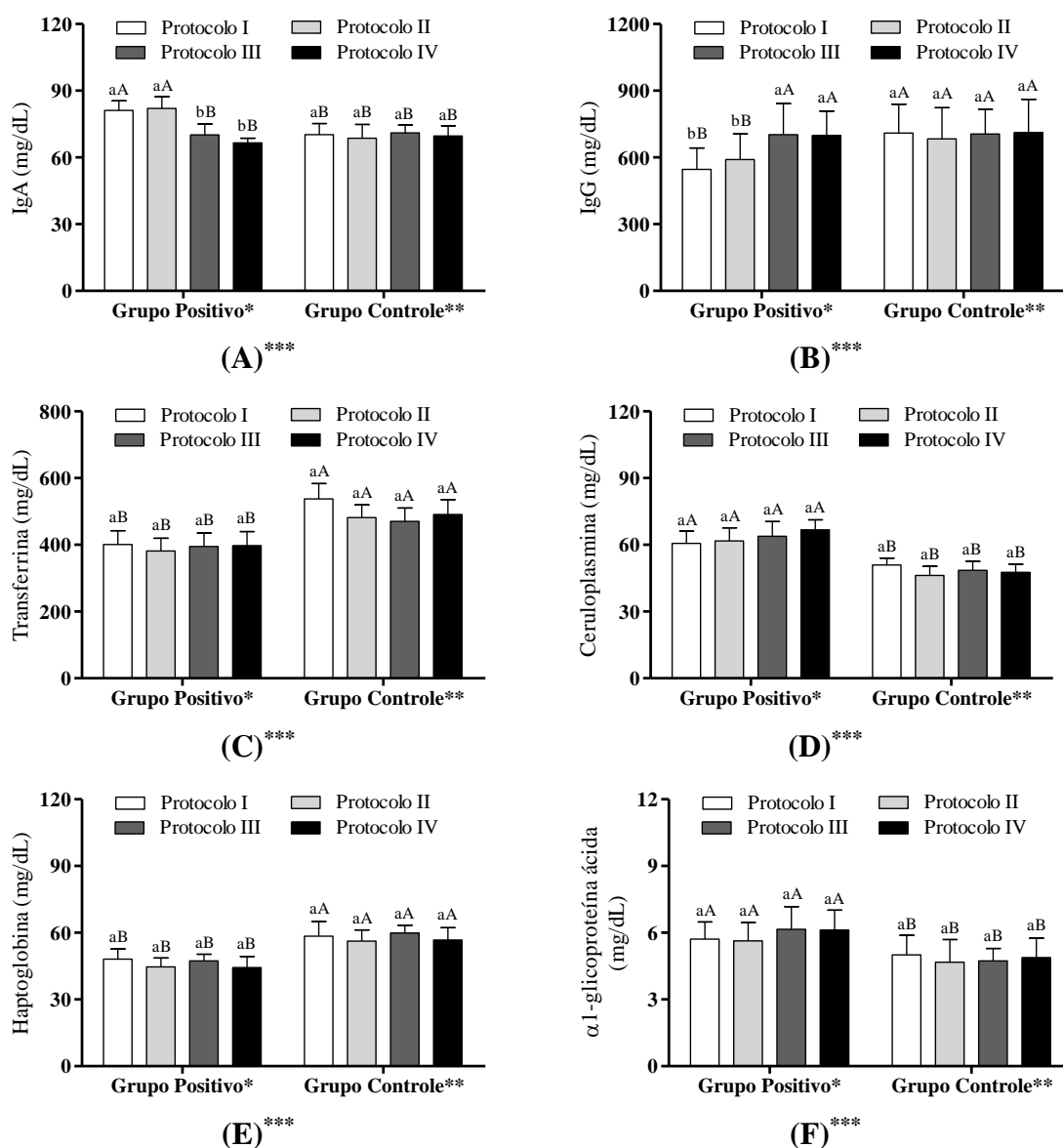
569 **Figura 9.** Proteínas totais (A), Albumina (B), Globulinas (C) e relação
570 Albumina:Globulinas (D) no soro de fêmeas suínas com artrite induzida por adjuvante na
571 fase de aleitamento, em diferentes grupos e protocolos de indução.

572 * Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
573 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
574 (Protocolo IV).

575 ** Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
576 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
577 (Protocolo IV).

578 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
579 SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupos,
580 pelo teste F ($P < 0,05$).
581

582 Para as demais frações proteicas séricas, denominadas proteínas de fase aguda, não
583 houve diferenças entre os protocolos avaliados ($P > 0,05$) dentro de cada grupo, exceto
584 para IgA e IgG, em que os protocolos I e II, do grupo positivo, resultaram em valores
585 superiores ($P < 0,05$) de IgA e inferiores de IgG (Figuras 10-A e 10-B).



587 **Figura 10.** Imunoglobulina A – IgA (A), Imunoglobulina G – IgG (B), Transferrina (C),
 588 Ceruloplasmina (D), Haptoglobina (E) e α 1-glicoproteína ácida (F) no soro de fêmeas
 589 suínas com artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento, em diferentes grupos e
 590 protocolos de indução.

591 *Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 592 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 593 (Protocolo IV).

594 **Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 595 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 596 (Protocolo IV).

597 ***Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias
 598 pelo teste de SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam
 599 diferença entre as médias pelo teste F ($P < 0,05$).
 600

601 Na comparação entre grupos positivo e controle, as concentrações de IgA foram
 602 superiores ($P < 0,05$) para os protocolos I e II e as concentrações de IgG foram inferiores

603 (P<0,05). Para os demais protocolos, as concentrações de IgA e IgG entre os grupos foram
604 similares (P>0,05).

605 As concentrações de transferrina e haptoglobina foram inferiores (P<0,05) para os
606 protocolos do grupo positivo (Figuras 10-C e 10-E), enquanto as concentrações de
607 ceruloplasmina e α -1-glicoproteína ácida foram superiores (P<0,05) para os protocolos
608 do grupo positivo (Figuras 10-D e 10-F).

609

610 *Infiltração de leucócitos no líquido sinovial*

611

612 A contagem de células leucocitárias no líquido sinovial (Tabela 6) foi similar entre
613 os protocolos de cada grupo (P>0,05). Na comparação entre os grupos, para todos os
614 protocolos de indução avaliados a contagem de células mononucleares,
615 polimorfonucleares e totais foi superior nos animais com artrite induzida (Figuras 11-A,
616 11-B e 11-C).

617

618 **Tabela 6.** Infiltração de leucócitos no líquido sinovial de fêmeas suínas no 15º dia após
619 o desmame, com artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento, em diferentes
620 grupos e protocolos de indução.

Leucócitos (cél. x 10 ³ / μ L)	Protocolos de Indução								EPM ³
	Grupo Positivo ¹				Grupo Controle ²				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Mononucleares ^{4,5}	10,12 ^{aA}	9,43 ^{aA}	11,28 ^{aA}	10,42 ^{aA}	2,23 ^{aB}	1,93 ^{aB}	2,04 ^{aB}	1,78 ^{aB}	364
Polimorfonucleares	15,61 ^{aA}	13,81 ^{aA}	14,09 ^{aA}	16,15 ^{aA}	4,81 ^{aB}	3,29 ^{aB}	2,87 ^{aB}	3,91 ^{aB}	481
Totais	26,61 ^{aA}	25,88 ^{aA}	27,12 ^{aA}	25,32 ^{aA}	6,17 ^{aB}	6,01 ^{aB}	6,68 ^{aB}	5,18 ^{aB}	419

621 1- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund[®] na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
622 (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

623 2- Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias (Protocolo
624 I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade (Protocolo IV).

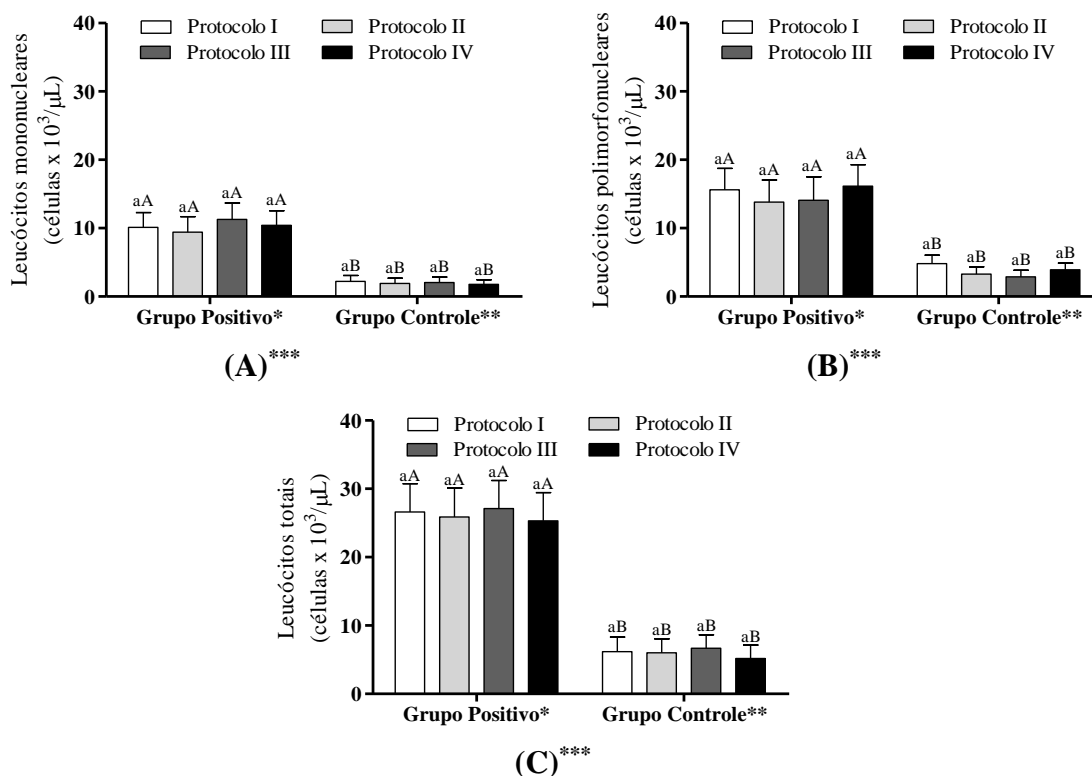
625 3- Erro padrão da média.

626 4- Letras minúsculas distintas entre protocolos, para o mesmo grupo, indicam diferença entre as médias pelo teste de
627 SNK (P<0,05).

628 5- Letras maiúsculas diferentes entre grupos, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre as médias pelo teste F
629 (P<0,05).

630

631



632 **Figura 11.** Leucograma do líquido sinovial de fêmeas suínas no 15º dia após o desmame
 633 com artrite induzida por adjuvante na fase de aleitamento, em diferentes grupos e
 634 protocolos de indução.

635 *Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange direita,
 636 aos 7 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 637 (Protocolo IV).

638 **Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7
 639 dias (Protocolo I), 7 e 14 dias (Protocolo II), 14 e 21 dias (Protocolo III) ou 7, 14 e 21 dias de idade
 640 (Protocolo IV).

641 *** Letras minúsculas distintas, para o mesmo grupo, indicam diferença entre os protocolos, pelo teste de
 642 SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas distintas, para o mesmo protocolo, indicam diferença entre os grupos,
 643 pelo teste F ($P < 0,05$).

644

645 **Discussão**

646

647 ***Peso vivo, temperatura superficial e avaliações morfológicas***

648 A artrite infecciosa pode acometer suínos em qualquer idade, mas é mais recorrente
 649 nas fases jovens, em que os leitões estão mais propensos à contaminação bacteriana por
 650 diversos agentes patogênicos, sendo os mais comuns *Streptococcus sp*, *Staphylococcus*
 651 *sp*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida* (Jonhston et al.,
 652 1987; Friede & Segall, 1996).

653 A infecção pode ocorrer nos primeiros dias de vida dos leitões, onde baias com
 654 pisos extremamente ásperos (concreto), molhados, compactos ou ripados, mas mantidos
 655 sujos (fezes da matriz e dos leitões) potencializam a contaminação bacteriana (Madec &

656 Fourichon, 1990). Outros fatores predisponentes podem ser o corte incorreto dos dentes
657 (ferimentos nas gengivas, alicates sujos, mal desinfetados ou sem fio); o corte de umbigo
658 sem a devida assepsia, ou cortado muito comprido (arrastando pelo piso da baia); e corte
659 da cauda muito curto, provocando sangramento (Morés et al., 2000; Morés et al., 2003).

660 As áreas afetadas apresentam-se inflamadas, com febre local, articulações inchadas,
661 com presença de exsudato, que pode ser seroso, sanguinolento e até purulento. Os animais
662 artríticos apresentam andar difícil e claudicante, associado à perda de peso e atraso no
663 desenvolvimento, inapetência, temperatura retal e articular elevadas (Graciano et al.,
664 2014). As articulações mais comumente afetadas são a tarso-falange, úmero-rádioulnar,
665 fêmur-tíbio-patelar, coxo-femural e escapuloumeral (Tittiger & Alexander, 1971; Cross
666 & Edwards, 1981).

667 O peso vivo reduzido para os animais artríticos foi relatado por Graciano et al.
668 (2014) e se assemelham aos resultados do presente trabalho, sendo que o atraso no
669 crescimento corporal pode ser justificado em função da inapetência gerada pela
670 inflamação.

671 Em trabalho realizado com suínos naturalmente diagnosticados com artrite,
672 Graciano et al. (2014) avaliaram a utilização de imagens termográficas para diagnóstico
673 da doença e observaram que os valores de temperatura superficial nos membros
674 debilitados foram menores em suínos não artríticos do que nos animais previamente
675 diagnosticados artríticos, concluindo que imagens termográficas permitem identificar a
676 inflamação articular em função da variação na temperatura superficial. No presente
677 estudo, o registro termográfico, associado às demais variáveis foi fundamental para a
678 confirmação do diagnóstico da inflamação articular.

679 A temperatura superficial mais elevada na articulação de animais artríticos se
680 justifica pelo fato de haver se instalado um processo inflamatório, caracterizado por uma
681 reação ou resposta de proteção em vista de uma irritação, injúria ou infecção ocorrendo,
682 além de inchaço e dor, também rubor e elevação de temperatura na articulação, devido à
683 vasodilatação no local (Reichling & Levine, 1999).

684 O uso de medidas alométricas, em relação ao peso vivo (cm/kg) é justificável, para
685 as mensurações de perímetro e diâmetro, porque naturalmente essas medidas
686 aumentariam em valores absolutos (cm), em função do aumento da idade dos animais,
687 estando os leitões artríticos ou não.

688 O aumento do perímetro e o diâmetro articular nos animais do grupo positivo
689 decorre do edema local ocasionado pela administração intradérmica do adjuvante

690 completo de FREUND, que desencadeia um estímulo quimiostático. De maneira similar
691 a esta pesquisa, Gomes et al. (2013) avaliaram o efeito de duas aplicações intra-articulares
692 de adjuvante completo de Freund na região tíbia-femural de ratos Wistar e observaram
693 aumento do diâmetro articular já no segundo dia após a primeira injeção.

694 A esse respeito, a literatura evidencia que a administração de 100 e 150µL de CFA
695 (1mg/mL, *Mycobacterium tuberculosis*) na articulação do joelho de ratos Wistar causa
696 hiperalgesia e edema por 14 e 90 dias, respectivamente (Wilson et al., 2006). Neste
697 mesmo sentido, em trabalho conduzido com ratos Wistar, Yu et al. (2002) administraram
698 125µL de CFA (250µg, *Mycobacterium butyricum*) na articulação do joelho e observaram
699 hiperalgesia e edema por 20 a 30 dias, o que reforça o resultado obtido no presente estudo,
700 de aumento no diâmetro articular onde houve a indução.

701 Embora sejam escassos os trabalhos com protocolos de indução de artrite em
702 suínos, os ratos cobaias constituem o modelo animal de mamíferos mais utilizado em
703 pesquisas de laboratório. Em experimento com ratos Wistar, Gomes et al. (2013)
704 avaliaram a indução de artrite por meio de duas aplicações de Adjuvante Completo de
705 Freund, sendo a primeira com *Mycobacterium tuberculosis* (1mg/mL; 50µL) na base da
706 cauda (intradérmica) e a segunda na articulação tibiotársica (intra-articular, 50µL), após
707 21 dias. Os autores observaram que houve aumento no volume do edema (mL) da
708 articulação tibiotársica até o 23º dia, sendo justificado pela inflamação no local.

709 A infiltração de neutrófilos e macrófagos desencadeia um processo inflamatório
710 local, caracterizado pela alteração morfométrica da articulação (Faria et al., 2009), o que
711 pode justificar os resultados morfológicos deste trabalho, inclusive os valores superiores
712 para volume do membro artrítico avaliados no grupo positivo em relação ao grupo
713 controle, em todos os protocolos avaliados.

714

715 ***Avaliações de estresse oxidativo***

716 As variáveis de estado oxidativo no plasma revelaram baixa concentração de GSH
717 nos protocolos do grupo positivo, um indicativo direto de estresse oxidativo,
718 provavelmente gerado pela manifestação da inflamação. Por se tratar de um agente de
719 defesa antioxidante, a GSH é consumida como cofator no processo de redução das ERO,
720 reduzindo sua concentração circulante. Logo, o baixo resultado de GSH, para animais do
721 grupo positivo demonstra que a defesa antioxidante foi acionada frente a um possível
722 aumento das ERO. A GSH age através de um complexo enzimático em conjunto com a

723 GPx e a glutathiona redutase (GRd), sendo utilizada como redutor intracelular, reagindo
724 com radicais livres e gerando um monômero oxidado (GS), que se liga a um segundo
725 monômero oxidado (SG), formando a glutathiona oxidada (GSSG) (Júnior et al., 1998).

726 Em trabalho realizado com humanos com diagnóstico positivo para artrite
727 reumatoide, Hassan et al. (2011) também observaram redução na concentração plasmática
728 de GSH, constatando que o estresse oxidativo decorrente da inflamação foi responsável
729 pela ativação do sistema antioxidante, resultando no consumo da GSH.

730 Quanto à TAC, o grupo positivo teve concentrações significativamente menores
731 ($P < 0,05$) em comparação ao controle. A TAC, por indicar a capacidade antioxidante total
732 de uma amostra, ou seja, a soma de diversas moléculas com função antioxidante (Ferrari,
733 2010), resultou em queda provavelmente porque as enzimas antioxidantes estão sendo
734 consumidas, o que explica as menores concentrações no protocolo positivo. Resultados
735 semelhantes foram obtidos por Bracht et al. (2016) no plasma de ratos poliartriticos.

736 A medida de avaliação de grupos tióis leva em consideração a concentração dos
737 compostos tióis presentes em aminoácidos e proteínas como homocisteína, cisteína,
738 cisteilglicina, glutathiona e albumina no plasma, que são compostos com potencial
739 antioxidante. Nesse sentido, Gonçalves et al. (2017) também obtiveram resultados
740 semelhantes para diminuição de grupos tióis. É provável que os animais submetidos ao
741 protocolo de indução tiveram seus grupos tióis utilizados para combater as ERO.

742 Os protocolos do grupo positivo apresentaram concentrações menores ($P < 0,05$) de
743 proteínas carboniladas, cuja síntese ocorre por ação das ERO. Devido à retirada de um
744 H^+ do carbono α da proteína ocorre uma fragmentação e oxidação da cadeia, produzindo
745 compostos carbonilados como aldeídos, cetonas e lactamas reativas (Fedorova, Bollineni
746 & Hoffman, 2014; Vasconcelos et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados
747 por Mateen et al. (2016), onde os valores para pacientes humanos com artrite reumatoide
748 foram significativamente maiores em comparação ao grupo controle, ao avaliar o plasma
749 sanguíneo. Uma possível causa desse aumento é justamente o estresse oxidativo que
750 estimula o processo de retirada de H^+ do carbono α e, conseqüentemente, estimula a
751 carbonilação das proteínas. De modo geral, as ERO realizam oxidação de
752 macromoléculas como DNA, lipídeos de membrana e proteínas (Comar et al., 2013).

753 Quanto às variáveis hepáticas, embora o peso relativo de fígado tenha sido similar
754 ($P > 0,05$) entre protocolos e grupos, a atividade da enzima catalase e a concentração da
755 SOD foram menores ($P < 0,05$) nos protocolos do grupo positivo. Atuando em conjunto
756 com a catalase, a SOD é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do O_2^- ,

757 transformando-o em peróxido de hidrogênio que posteriormente será transformado em
758 água e gás oxigênio pela catalase (Weydert & Cullen, 2010). Ambas fazem parte da
759 redução do O_2^- e H_2O_2 em água. Resultados semelhantes foram encontrados por Comar
760 et al. (2013), ao avaliarem a atividade hepática de catalase em ratos com artrite induzida
761 por adjuvante e por Sukketsiri et al. (2016), ao avaliarem o fígado de ratos com artrite
762 induzida por adjuvante.

763

764 *Proteínas de fase aguda*

765 A menor concentração ($P<0,05$) de proteínas totais para os protocolos do grupo
766 positivo pode ter ocorrido devido à maior carbonilação de proteínas observada no plasma
767 de animais desse mesmo grupo, associada à redução ($P<0,05$) na concentração de
768 albumina plasmática. Resultados semelhantes foram encontrados por Comar et al. (2013),
769 para concentração de albumina e globulina e sua relação no plasma de ratos.

770 Albumina e globulina estão diretamente relacionadas às avaliações de inflamações
771 crônicas. A albumina sérica contém Cisteína-34 (Cys34), um tipo de cisteína que serve
772 de fonte de tióis livres no plasma humano (70-80%), e por conta dessa característica age
773 reduzindo radicais livres. Além disso, possui resíduos de metionina (Met87, Met123,
774 Met298, Met329, Met 446 e Met548) que têm sido estudados por realizarem atividade
775 antioxidante (Bracht et al., 2016; Fanali et al., 2012).

776 Portanto, devido ao fato da albumina possuir cisteína, que compõe os grupos tióis,
777 realiza importante papel de defesa contra radicais livres, principalmente no sangue, onde
778 está presente em maior quantidade. A albumina é consumida no processo, explicando os
779 menores valores obtidos para o grupo positivo. Além disso, a albumina é considerada
780 uma proteína de fase aguda de resposta negativa, ou seja, na grande maioria das espécies,
781 quando o sistema imunológico for ativado, a concentração de albumina no sangue tende
782 a diminuir devido à redução da sua síntese pelo fígado (Cray, Zaias & Altman, 2009).
783 Quanto às globulinas, o aumento observado para os protocolos do grupo positivo pode
784 ser explicado por ser uma proteína de fase aguda positiva, cuja síntese hepática se eleva
785 em resposta a uma inflamação (Bracht et al., 2016).

786 As proteínas de fase aguda são uma classe de proteínas cuja concentração
787 plasmática aumenta (proteínas de fase aguda positivas) ou diminui (proteínas de fase
788 aguda negativas) em resposta à inflamação. Essa resposta é chamada de resposta de fase
789 aguda. Em resposta a danos, células inflamatórias locais (neutrófilos,
790 granulócitos e macrófagos) secretam diversas citocinas na corrente sanguínea,

791 notavelmente as interleucinas IL1, IL6 e IL8, além de TNF α . O fígado responde
792 produzindo um número de reagentes de fase aguda. Ao mesmo tempo, a produção de
793 diversas outras proteínas é reduzida; denominadas, então, reagentes negativos da fase
794 aguda. O aumento de certas proteínas de fase aguda pelo fígado pode contribuir para a
795 promoção da sepse (Abbas, Lichtman & Pillai, 2014).

796 No presente estudo, exceto a IgA e IgG, que foram similares entre os protocolos III
797 e IV nos grupos positivo e controle, as demais proteínas de fase aguda (transferrina,
798 ceruloplasmina, haptoglobina e α 1-glicoproteína ácida) diferiram entre os grupos
799 avaliados, para todos os protocolos de indução. De modo similar, ao avaliarem as
800 proteínas de fase aguda em ratos com poliartrite, Bracht et al. (2016) observaram diferença
801 nos resultados para animais em comparação ao grupo controle, devido à ativação do
802 sistema imunológico.

803

804 *Infiltração de leucócitos no líquido sinovial*

805

806 O líquido sinovial é um dialisado do plasma viscoso, produzido pela membrana
807 sinovial, com função de lubrificação e nutrição, auxiliando no suporte mecânico e na
808 absorção de impacto. Ele é livre de material floculento ou fragmentos, possui coloração
809 de clara à palha amarelada, e contém hialuronato, eletrólitos, glicose, proteínas e enzimas
810 (Korenek et al., 1992; Martins, Silva e Baccarin, 2007).

811 Os leucócitos são divididos de acordo com sua morfologia em mononucleares ou
812 agranulócitos, com núcleo não segmentado e sem grânulos no citoplasma (monócitos e
813 linfócito) e polimorfonucleares ou granulócitos, que possuem núcleo segmentado e
814 grânulos citoplasmáticos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) (Guyton e Hall, 2006).

815 O número total de leucócitos em articulações não inflamadas é geralmente menor
816 do que 1.000 células / μ L, em que predominam células mononucleares (90%), com
817 número de neutrófilos menor que 10% do total de leucócitos (Latimer et al., 2000).

818 A infiltração de leucócitos no líquido sinovial é o evento mais relevante durante a
819 artrite, uma vez que está envolvida na destruição do tecido e em todas as consequências
820 de longa duração decorrentes desta destruição (Gomes et al., 2013). No presente estudo,
821 o aumento das concentrações de leucócitos mononucleares, poliformonucleares e totais
822 nos animais do grupo positivo em relação ao grupo controle, independente do protocolo
823 de indução de artrite avaliado, indica claramente a manifestação da inflamação no local
824 da aplicação do adjuvante.

825 Em trabalho realizado em abatedouro de suínos, Alberton et al. (2003) avaliaram as
826 articulações de 50 suínos diagnosticados com artrite infecciosa, por diferentes agentes
827 patogênicos. Os autores determinaram a contagem diferencial de leucócitos no líquido
828 sinovial das articulações artríticas e observaram que cerca de 70% dos leucócitos foram
829 polimorfonucleares e 30% mononucleares, representados principalmente por linfócitos.
830 Além disso, os autores observaram que as membranas sinoviais apresentavam-se
831 acentuadamente hipertrofiadas, formando massa aveludada, com as vilosidades dilatadas
832 na maioria dos casos.

833 O conjunto de variáveis determinadas no presente estudo permite diagnosticar os
834 animais de todos os protocolos do grupo positivo como monoartríticos, com lesão
835 desenvolvida na articulação onde foi realizada a injeção do adjuvante completo de
836 FREUND, indicando a efetividade dos protocolos de indução. Essa pesquisa pode ser
837 importante para padronização de um protocolo de indução de artrite em leitões, com o
838 objetivo de realizar trabalhos futuros que busquem mitigar seus efeitos na fase pós-
839 desmame.

840 Todos os protocolos de indução de artrite em fêmeas suínas em fase de aleitamento
841 resultam na manifestação da doença na fase pós-desmame. A aplicação de adjuvante aos
842 7 dias é o protocolo indicado, devido à viabilidade técnica, pois os animais são mais leves,
843 de fácil contenção e utiliza-se apenas uma dose de adjuvante.

844

845 **5. Conclusão**

846

847 Todos os protocolos de indução de artrite por adjuvante avaliados em leitões na fase
848 de aleitamento resultam em elevação da temperatura superficial, alterações das variáveis
849 morfológicas articulares, estresse oxidativo no plasma e fígado, alterações na
850 concentração sérica de proteínas de fase aguda e na infiltração de leucócitos no líquido
851 sinovial na fase pós-desmame.

852

853 **Conflito de interesse**

854

855 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

856

857 **Financiamento**

858

859 Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento
860 Científico e Tecnológico – CNPq (Processo nº 404804/2016-0).

861

862 **Referências**

863

864 Abbas A.K.; Lichtman A.H.H.; Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 8th. ed.
865 Saunders, 2014.

866 Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed), Methods of Enzymatic Analysis.
867 VerlagChemie – Academic Press, Weinheim-London, pp. 674-678.

868 Alberton, G. C., Bandarra, E. P., Piffer, I., Mores, M. A. Z., Pereira, M. A. C., &
869 Yamamoto, M. T. (2003). Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e
870 físico-químico das articulações de suínos artríticos no matadouro. Archives of
871 Veterinary Science, 8(1).

872 Bracht, A., Silveira, S.S., Ghizoni, C.V.C., Oliveira, M.R., Amado, C.A.B., Peralta, R.M.,
873 Comar, J.F., 2016. Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate
874 rats with monoarthritis and polyarthritis. SpringerPlus 5, 1, 36.

875 Bressan E, Cunha FQ, Tonussi CR. Contribution of TNFa, IL-1b and CINC-1 for articular
876 incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis.
877 Cytokine 2006;36:83-9.

878 Bressan E, Cunha Fq, Tonussi CR. Contribution of TNFa, IL-1b and CINC-1 for articular
879 incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis.
880 Cytokine 2006;36:83-9.

881 Cai, Y., Zimmerman, D.R., Ewan, R.C., 1994. Diurnal variation in concentrations of
882 plasma urea nitrogen and amino acids in pigs given free access to feed or fed twice
883 daily. Journal Nutrition 124, 1088-1093.

884 Comar, J.F., Sá-Nakanishi, A.B., Oliveira, A.L., Wendt, M.M.N., Amado, C.A.B.,
885 Iwamoto, E.L.I., Peralta, R.M., Bracht, A., 2013. Oxidative state of the liver of rats
886 with adjuvant-induced arthritis. Free Radical Biology and Medicine 58, 144-153.

887 Cray, C., Zaias, J., Altman, N.H., 2009. Acute Phase Response in Animals: A Review.
888 Comparative Medicine 59, 6, 517-526.

889 Cross, G.M.; Edwards, M.J. 1981. The detection of arthritis in an abattoir and its public
890 health significance. Australian Veterinary Journal, v.57, p.153-158.

891 Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant
892 capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical
893 Biochemistry 37, 4, 277-281.

894 Fanali, G., Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., Ascenzi, P., 2012. Human
895 serum albumin: From bench to bedside. Molecular Aspects of Medicine 33, 209-290.

- 896 Faria TJ, Souza-Silva E, Oliveira DT, Senna EL, Tonussi CR. Evaluation of the pro-
897 inflammatory potential of nanostructured drug carriers in knee-joints of rats: effect on
898 nociception, edema, and cell migration. *J Pharm Sci.* 2009;98(12):4844-51.
- 899 Faure, P., Lafond, J.L., 1995. Measurement of plasma sulphidryl and carbonyl groups as
900 a possible indicator of protein oxidation, in: Favier, A.E., Cadet, J., Kalyanaraman, B.,
901 Fontecave, M., Pierre, J.L. (Eds.), *Analysis of free radicals in biological systems.*
902 Basel: Birkhauser Verlag, pp. 238-247.
- 903 Fedorova, M., Bollineni, R.C., Hoffman, R., 2014. Protein carbonylation as a major
904 hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrometry*
905 *Reviews* 33, 79-97.
- 906 Ferrari, C.K.B., 2010. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos,
907 experimentais e nutricionais. *Journal of the Health Sciences Institute* 28, 4, 307-310.
- 908 Friede, I.; Segall, T. 1996. Inflammation of the joint at growing fattening pigs. *Svensk*
909 *Veterinar Tidning*, v.48, p.453-457.
- 910 Gomes, R. P., Bressan, E., Silva, T. M. D., Gevaerd, M. D. S., Tonussi, C. R., &
911 Domenech, S. C. (2013). Standardization of an experimental model suitable for studies
912 on the effect of exercise on arthritis. *Einstein (São Paulo)*, 11(1), 76-82.
- 913 Gonçalves, G.A., Soares, A.A., Correa, R.C.G., Barros, L., Haminiuk, C.W.I., Peralta,
914 R.M., Ferreira, I.C.F.R., Bracht, A., 2017. Merlot grape pomace hydroalcoholic extract
915 improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvante-induced
916 arthritis. *Journal of Functional Foods* 33, 408-418.
- 917 Graciano, D.E., Nääs, I.A., Garcia, R.G., Caldara, F.R., Santana, M.R., Nascimento, G.R.,
918 2014. Identificação de artrite em suíno utilizando imagem termográfica. *Boletim de*
919 *Indústria Animal* 71, 1, 79-83.
- 920 Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). Resistência do corpo à Infecção: I. Leucócitos,
921 Granulócitos, Sistema Monocítico-Macrofágico e Inflamação. *Tratado de Fisiologia*
922 *Médica*, 12, 447-456.
- 923 Hassan, S.Z., Gheita, T.A., Kenawy, S.A., Fahim, A.T., El-Sorougy, I.M., Abdou, M.S.,
924 2011. Oxidative stress in systemic lúpus erythematosus and rheumatoid arthritis
925 patients: relationship to disease manifestations and activity. *Internation Journal of*
926 *Rheumatic Diseases* 14, 352-331.
- 927 Jonhston, K.M.; Doige, C.E.; Osborne, A.D. 1987. An evaluation of nonsuppurative joint
928 disease in slaughter pigs. *Canadian Veterinary Journal*, v.28, p.174-180.
- 929 Júnior, A.A.J., Chiarello, P.G., Bernardes, M.S.M., Vannucchi, H., 1998. Peroxidação
930 Lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e vitamina E. *Medicina (Ribeirão Preto)*
931 31, 3, 434-449.
- 932 Korenek, N.L. et al. Determination of total protein concentration and viscosity of synovial
933 fluid from the tibiotarsal joints of horses. *American Journal Veterinary Research*, v.53,
934 n.5, p.781-784, 1992.

- 935 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
936 bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 937 Latimer, F. G., Pasquini, C., & Kaneps, A. J. (2000). Stifle disease in
938 horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 22(4),
939 381-390.
- 940 Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B.,
941 Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively
942 modified proteins. *Methods of Enzymology* 186, 464-478.
- 943 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement
944 with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193, 1, 265-275.
- 945 Madec, F., & Fourichon, C. (1990). Les facteurs de risque en epidemiologie
946 animale. *Epidémiol. Santé Anim.*, (18), 31-43.
- 947 Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the
948 oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European
949 Journal of Biochemistry* 47, 469-474.
- 950 Martins, E. A. N., Silva, L. C. L. C. D., & Baccarin, R. Y. A. (2007). Líquido sinovial da
951 articulação femuropatelar após desmotomia patelar medial experimental em
952 equinos. *Ciência Rural*, 37(3), 784-788.
- 953 Moreno, A.M., Sobestiansky, J., Lopez, A.C., Sobestiansky, A.A.B., 1997. Colheita e
954 processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico. *Embrapa
955 Suínos e Aves-Documents - INFOTECA-E*.
- 956 Morés, N.; Pierosan, R.; Amaral, A.L.; Barioni Júnior, W. 2003. Fatores de risco
957 associados com artrites em suínos de abate. *Arquivo Brasileiro de Medicina
958 Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.528- 532.
- 959 Morés, N.; Sobestiansky, J.; Barioni Junior, W. et al. 2000. Fatores de risco associados
960 aos problemas dos leitões na fase de creche em rebanhos da região sul do Brasil.
961 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, p.191-199.
- 962 National Research Council, 2012. *Nutrients requirement of swine*, 11th edition. The
963 National Academic Press, Washington, DC.
- 964 Neto, N.S.R., Carvalho, J.F., 2009. O uso de provas de atividade inflamatória em
965 reumatologia. *Revista Brasileira de Reumatologia* 49, 4, 413-430.
- 966 Oliveira, C.M.B., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, R.M., Salomão, R., 2011. Citocinas
967 e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 61, 2, 255-265.
- 968 Pearson, C.M., Wood, F.D., 1963. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by
969 the injection of mycobacterial adjuvant. *American Journal of Pathology* 42, 1, 73-95.
- 970 Reichling, D. B., & Levine, J. D. (1999). The primary afferent nociceptor as pattern
971 generator. *Pain*, 82, S103-S109.

- 972 SAS INSTITUTE. 2010. SAS user's guide: statistic – Cary: Institute.
- 973 Sukketsiri, W., Chonpathompikunlert, P., Tanasawet, S., Choosri, N., Wongtawatchai,
974 T., 2016. Effects of *Apium graveolens* on the Oxidative Stress in the Liver of
975 Adjuvant-Induced Arthritic Rats. Preventive and Nutrition Food Science 21, 2, 79-84.
- 976 Tittiger, F.; Alexander, D.C. 1971. Studies on the bacterial flora of condemned portions
977 from arthritic hogs. Canadian Journal of Comparative Medicine, v.35, p.244-248.
- 978 Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.N., Manfredini, V., Benfato, M.S.,
979 Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e
980 marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para
981 sua determinação. Química Nova 30, 5, 1323-1338.
- 982 Weydert, C.J., Cullen, J.J., 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and
983 glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nature Protocols 5, 1, 51.
- 984 Wilson AW, Medhurst SJ, Dixon CI, Bontoft NC, Winyard LA, et al. An animal model
985 of chronic inflammatory pain: Pharmacological and temporal differentiation from
986 acute models. Eur J Pain. 2006;10(6):537-49.
- 987 Yu YC, Koo ST, Kim CH, Lyu Y, Grady JJ, Chung JM. Two variables that can be used
988 as pain indices in experimental animal models of arthritis. J Neurosc Methods.
989 2002;115(1):107-13.
- 990 Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang,
991 J., 2012. Diseases of Swine, 10th edition. Wiley-Blackwell, pp. 303-306.

ARTIGO 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32**O óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado mitiga os efeitos do estresse oxidativo em leitões desmamados submetidos à artrite induzida na fase de aleitamento²**

Resumo: Artrites são inflamações articulares que geram atraso no desenvolvimento de leitões, perda de peso, resposta inflamatória e estresse oxidativo. Produtos com alto teor de polifenóis e flavonoides podem prevenir ou mitigar os efeitos secundários, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Objetivou-se com este trabalho avaliar o óleo essencial de laranja (limoneno) microencapsulado sobre o desempenho, variáveis morfológicas, bioquímicas, hematológicas e de estado oxidativo no sangue dos leitões desmamados, com ou sem artrite induzida na fase de aleitamento. O período experimental foi considerado desde o dia do desmame até o 15º dia após o desmame. Foram utilizadas 64 fêmeas suínas com peso médio inicial de $5,67 \pm 0,18$ kg, desmamadas aos 21 dias. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 X 4, cujos tratamentos consistiram na indução de artrite por adjuvante ou não e 4 rações experimentais: controle negativo (ração sem adição de antibiótico ou limoneno), controle positivo (ração com antibiótico: 300 ppm de lincomicina 44%), limoneno (ração com limoneno: 500 ppm de D-limoneno 12,38%) e limoneno + antibiótico (ração com limoneno: 250 ppm de D-limoneno 12,38% + antibiótico: 150 ppm de lincomicina 44%). Foram utilizadas 8 repetições por tratamento e um animal por unidade experimental. A indução de artrite por adjuvante na fase de aleitamento resulta em queda de peso ao desmame, piora no desempenho, estresse inflamatório e oxidativo, aumento da temperatura superficial e das variáveis morfológicas da articulação. O uso de Limoneno microencapsulado (500 ppm de D-limoneno 12,38%) ou de Limoneno microencapsulado + Antibiótico (250 ppm de D-limoneno 12,38% + 150 ppm de lincomicina 44%) mitigam os efeitos do estresse oxidativo em animais na fase pós-desmame gerados pela artrite induzida na fase de aleitamento.

Palavras-chave: Inflamação articular em leitões, Limoneno, Microencapsulação.

² Artigo redigido conforme normas da revista *Livestock Science* (ISSN:1871-1413).

33 The microencapsulated orange essential oil (limonene) mitigates the effects of oxidative
34 stress in weaned piglets submitted to arthritis induced in the lactation phase

35

36 Protocols for arthritis induction in suckling piglets and their effects on morphological
37 variables, oxidative status and inflammatory response after weaning

38

39

40 Abstract: Arthritis are joint inflammations that cause delay in the piglets' development,
41 weight loss, inflammatory response and oxidative stress. Products with a high content of
42 polyphenols and flavonoids can prevent or mitigate these effects, due to their
43 antimicrobial and antioxidant properties. The objective of this work was to evaluate the
44 microencapsulated orange essential oil (limonene) on the performance, morphological,
45 biochemical, hematological and oxidative status variables in the blood of weaned piglets,
46 with or without arthritis induced during the lactation phase. The experimental period was
47 considered from the day of weaning until the 15th day after weaning. 64 female pigs with
48 an average initial weight of 5.67 ± 0.18 kg were used, weaned at 21 days. The animals
49 were distributed in a randomized block design, in a 2 X 4 factorial scheme, whose
50 treatments consisted of inducing arthritis by adjuvant or not and four experimental diets:
51 negative control (diet without the addition of antibiotics or limonene), positive control
52 (antibiotic diet: 300 ppm lincomycin 44%), limonene (diet with limonene: 500 ppm D-
53 limonene 12.38%) and limonene + antibiotic (diet with limonene: 250 ppm D-limonene
54 12.38% + antibiotic: 150 ppm of 44% lincomycin). Eight repetitions per treatment and
55 one animal per experimental unit were used. The arthritis induction by adjuvant in the
56 lactation phase results in weight loss at weaning, worsening in performance,
57 inflammatory and oxidative stress, increased surface temperature and joint morphological
58 variables. The use of microencapsulated Limonene (500 ppm D-limonene 12.38%) or
59 microencapsulated Limonene + Antibiotic (250 ppm D-limonene 12.38% + 150 ppm
60 lincomycin 44%) mitigates the effects of oxidative stress in animals in the post-weaning
61 phase generated by arthritis induced in the lactation phase.

62 Keywords: Joint inflammation in piglets, Limonene, Microencapsulation.

63

64

65

Highlights

66 1- Infecções microbianas em leitões lactentes podem gerar artrites nas fases subsequentes.

67 2- Leitões lactentes foram induzidos com artrite por adjuvante aos 7 dias de idade.

68 3- Artrite induzida em leitões lactentes reduz o peso vivo e o desempenho pós-desmame.

69 4- Artrite induzida em leitões lactentes gera resposta inflamatória e estresse oxidativo.

70 5- Limoneno microencapsulado em dietas de leitões artríticos mitiga o estresse oxidativo.

71

1. Introdução

73 As artrites são inflamações articulares causadas principalmente por infecção
74 bacteriana decorrente de manejo sanitário ou profilático inadequados, que acometem
75 principalmente os leitões, causando atraso no crescimento, descarte precoce, formação de
76 animais refugos, óbitos ou condenação de carcaças nos abatedouros (Hill, 1992; Alberton

77 et al., 1999; Morés et al., 2000). Os animais artríticos mostram andar difícil e claudicante,
78 apresentam atraso no desenvolvimento e, às vezes, perda de peso, inapetência e ainda
79 temperatura retal e corporal elevadas (Graciano et al., 2014). As articulações mais
80 comumente afetadas são a tarso-falange, úmero-rádioulnar, fêmur-tíbio-patelar, coxo-
81 femural e escápulo-umeral (Tittiger e Alexander, 1971; Cross e Edwards, 1981).

82 A contaminação pode ocorrer nos primeiros dias de vida dos leitões. Fatores como
83 tempo prolongado de baia úmida e/ou suja, independente do tipo de piso, potencializa a
84 contaminação bacteriana (Madec e Fourichon, 1990). Outros pontos predisponentes à
85 contaminação se relacionam ao manejo direto com o leitão, por exemplo: o corte dos
86 dentes feito de maneira incorreta (uso de equipamento não esterilizado e causa de
87 sangramento no processo); realização do corte de umbigo sem a devida assepsia local ou
88 feito na distância incorreta do abdômen; corte inadequado da calda, entre outros fatores
89 que envolvam processos de cicatrização (Morés et al., 2000; Morés et al., 2003). Além
90 disso, leitões castrados tendem a um nível maior de cortisol, quando comparados a não
91 castrados, influenciando diretamente no sistema de defesa imunológica (Moya et al. 2008;
92 Jayaraman e Nyachoti, 2017).

93 Por se tratar de um processo inflamatório, a artrite resulta em alterações metabólicas
94 que geram elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e outras espécies
95 reativas. Essas ERO naturalmente fazem parte do metabolismo dos animais como
96 consequência do metabolismo do oxigênio molecular (O_2) e têm como função, em
97 condições normais, eliminar agentes agressores, entretanto o excesso de ERO pode
98 acarretar estresse oxidativo (Ferreira e Matsubara, 1997; Vasconcelos et al., 2007).

99 Neste sentido, produtos com alto teor de polifenóis e flavonoides despertam
100 interesse devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, com enorme
101 potencial de prevenção ou mitigação de artrites em suínos. Dentre as principais fontes de
102 compostos fenólicos estão as frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, ou seus
103 resíduos industriais, após a extração do suco (Davis, 2004).

104 Óleos essenciais são exemplos de aditivos alimentares que podem aprimorar a
105 defesa imunológica dos suínos durante situações críticas, elevando a defesa antioxidante
106 não enzimática e auxiliando no *status* sanitário do organismo (Franz et al., 2010). O D-
107 limoneno é o principal componente do óleo essencial de laranja. Constitui um terpeno
108 com aroma acentuado e sabor levemente amargo. Sua captação é convencionalmente
109 realizada por extração com solvente hexano. Também pode ser realizada destilação a
110 vapor e extração por micro-ondas (Sun et al., 2009; Ozturk et al., 2019).

111 Estudos com humanos revelaram que o uso do limoneno como agente antioxidante
112 reduz a peroxidação lipídica e poupa atividade de enzimas antioxidantes superóxido
113 dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase (Murali, 2013; Bai
114 et al., 2016). Em alguns casos, o limoneno não apresenta efeito antibacteriano
115 clinicamente significativo, mas pode modular a ação dos antibióticos contra as bactérias
116 resistentes a múltiplas drogas (De Araújo et al., 2020). Essa modulação e controle
117 bacteriano pode auxiliar na redução de crescimento de bactérias patogênicas como
118 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*,
119 *Staphylococcus epidermidis* e outras cepas fúngicas como *Aspergillus flavus* e
120 *Trichophyton alba* (Khan et al., 2012), demonstrando sua ampla atuação sinérgica à saúde
121 e bem estar de humanos e animais.

122 Diante da constante alteração das normas para inclusão de antibióticos, pesquisas
123 são desenvolvidas na tentativa de reduzir a inclusão dos mesmos nas dietas animais,
124 evitando assim a resistência bacteriana, o que é benéfico para os animais e para os
125 humanos. A redução no uso de antibióticos das dietas dos animais pode diminuir em até
126 15% a prevalência de bactérias resistentes e de 24 a 32% de bactérias multiresistentes no
127 organismo animal (Tang et al., 2017).

128 Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar o óleo essencial de laranja
129 microencapsulado sobre o desempenho, parâmetros morfológicos, bioquímicos,
130 hematológicos e de estado oxidativo no sangue dos leitões desmamados, com ou sem
131 artrite induzida na fase de aleitamento.

132

133 **2. Material e métodos**

134 Foi realizado um ensaio de desempenho no Setor de Suinocultura da Fazenda
135 Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá
136 (UEM), localizada no Estado do Paraná (23°21'S, 52°04'W, a 564m de altitude). Todos
137 os procedimentos experimentais foram previamente submetidos à apreciação do Comitê
138 de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA/UEM), tendo sido
139 aprovados para execução (Parecer nº 2086220217).

140

141 **2.1. Animais e instalações**

142

143 Foram utilizadas 64 fêmeas suínas mestiças (AGPIC425 x Topigs 20), com peso
144 médio inicial de $5,67 \pm 0,18$ kg, desmamadas com 21 dias de idade e alojadas

145 individualmente em baias suspensas de 1,32 m² (1,50 x 1,70 m), separadas entre si por
 146 divisória de grades de ferro, com comedouros frontais semiautomáticos e bebedouros tipo
 147 nipple, localizadas em creche de alvenaria, com piso misto (concreto maciço e polietileno
 148 vazado) e telha de amianto, com ventiladores de parede, cortinas basculantes de lona e
 149 lâmpadas incandescentes como fonte de calor suplementar.

150 Como protocolo sanitário na sala de creche experimental, primeiramente foi
 151 retirada a matéria orgânica aderida às grades de metal, comedouros, chão e paredes, com
 152 o auxílio de espátula e bomba d'água de alta pressão. Posteriormente, a sala foi
 153 desinfetada com vassoura de fogo (após secagem), solução de cal aplicada no piso e
 154 paredes, além de solução de hipoclorito 1:20. Depois de desinfetada, a sala foi mantida
 155 em vazio sanitário por sete dias, em média.

156 A sala de creche foi equipada com um termohigrômetro digital, e as temperaturas
 157 mínima e máxima médias registradas foram de $18,5 \pm 4,58^{\circ}\text{C}$ e $29,6 \pm 5,02^{\circ}\text{C}$,
 158 respectivamente. A umidade relativa oscilou entre $48,66 \pm 6,11\%$ e $75,23 \pm 10,90\%$.

159

160 2.2. Delineamento experimental

161

162 Os animais foram distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso,
 163 em esquema fatorial 2 X 4, cujos tratamentos consistiram na indução de artrite por
 164 adjuvante ou não e 4 rações experimentais. Foram utilizadas 8 repetições por tratamento
 165 e um animal por unidade experimental. Na formação dos blocos, foram considerados o
 166 peso inicial e o parentesco dos animais.

167 2.3. Dietas experimentais

168 As rações experimentais (Tabela 1) foram formuladas à base de milho, farelo de
 169 soja, soro de leite em pó, leite integral em pó, farinha de peixe, açúcar, óleo de soja,
 170 vitaminas, minerais, aminoácidos e aditivos, para atender em, no mínimo, às exigências
 171 nutricionais propostas pelo NRC (2012), para suínos dos 7,0 aos 11,0 kg.

172

173 Tabela 1. Composição centesimal, química e energética das rações experimentais para
 174 leitões dos 7,0 aos 11,0 kg com ou sem antibiótico ou limoneno.

Ingredientes (g/kg)	Tratamentos		
	Controle Negativo	Controle Positivo	Limoneno Limoneno + antibiótico

Lincomicina 44% (ppm)	-	300	-	150
D-limoneno 12,38% (ppm)	-	-	500	250
Milho	617,40	617,40	617,40	617,40
Farelo de soja	123,22	123,22	123,22	123,22
Farinha de peixe	50,00	50,00	50,00	50,00
Soro de leite em pó	60,00	60,00	60,00	60,00
Leite integral em pó	50,00	50,00	50,00	50,00
Açúcar	30,00	30,00	30,00	30,00
Óleo de soja	20,00	20,00	19,05	19,08
Calcário	9,561	9,561	9,561	9,561
Fosfato bicálcico	12,012	12,012	12,012	12,012
Sal comum	7,293	7,293	7,293	7,293
L-lisina HCl (78,4%)	8,573	8,573	8,573	8,573
DL-metionina (99,0%)	3,022	3,022	3,022	3,022
L-treonina (98,5%)	3,016	3,016	3,016	3,016
L-triptofano (98,0%)	0,711	0,711	0,711	0,711
Premix vitam.-mineral ¹	5,000	5,000	5,000	5,000
Antioxidante ²	0,100	0,100	0,100	0,100
Lincomicina 44%	0,000	0,030	0,000	0,015
D-limoneno 12,38%	0,000	0,000	0,050	0,025
Inerte ³	0,050	0,020	0,000	0,010
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição calculada				
EM (Mcal/kg)	3,40	3,40	3,40	3,40
N total (g/kg)	34,30	34,30	34,30	34,30
PB (g/kg)	214,20	214,20	214,20	214,20
Lactose (g/kg)	67,64	67,64	67,64	67,64
EE (g/kg)	5,21	5,21	5,21	5,21
FB (g/kg)	20,40	20,40	20,40	20,40
FDN (g/kg)	103,50	109,60	103,50	109,60
FDA (g/kg)	42,40	42,40	42,40	42,40
Ca (g/kg)	10,68	10,68	10,68	10,68
P disponível (g/kg)	5,28	5,28	5,28	5,28

Sódio (g/kg)	2,24	2,24	2,24	2,24
Potássio (g/kg)	5,20	5,20	5,20	5,20
Cloro (g/kg)	2,14	2,14	2,14	2,14
Lisina digestível (g/kg)	14,51	14,51	14,51	14,51
Met+Cis digestível (g/kg)	8,13	8,13	8,13	8,13
Treonina digestível (g/kg)	9,72	9,72	9,72	9,72
Triptofano digestível (g/kg)	2,76	2,76	2,76	2,76
Arginina digestível (g/kg)	14,51	14,51	14,51	14,51
Valina digestível (g/kg)	10,01	10,01	10,01	10,01
Isoleucina digestível (g/kg)	7,98	7,98	7,98	7,98
BED (mEq/kg) ⁴	170,02	170,02	170,02	170,02

175 ¹Conteúdo/kg da dieta: ferro – 0,12 g; cobre – 17,23 mg; cobalto – 0,69 mg; manganês – 0,06 mg; zinco –
 176 0,16 g; iodo – 1,44 mg; selênio – 0,55 mg; vit. A - 12.300 U.I.; vit D₃ – 2.705 U.I.; vit. E – 74 U.I.; vit B₁
 177 – 1,81 mg; vit B₂ – 6,73 mg; vit. B₆ – 3,91 mg; vit B₁₂ - 37 mcg; niacina – 0,05 mg; ácido pantotênico –
 178 27,10 mg; vit. K₃ – 5,50 mg; ácido fólico – 0,57 mg; biotina – 0,18 mg.; colina – 0,36 g. ²BHT (Butil-
 179 hidroxil Tolueno). ³Caulim. ⁴Balanço eletrolítico da dieta.

180

181 Os dados de composição bromatológica dos alimentos utilizados nas rações foram
 182 obtidos por meio de análises realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e
 183 Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá (LANA-UEM). Foram realizadas
 184 as análises de matéria seca (Método 930.15; AOAC, 2006), proteína bruta (Método
 185 984.13; AOAC, 2006), extrato etéreo (Método 920.85; AOAC, 1990), fibra bruta
 186 (Método 962.09; AOAC, 2006), fibra em detergente ácido (Método 973.18; AOAC,
 187 1990), fibra em detergente neutro (Mertens, 2002), matéria mineral (Método 942.05;
 188 AOAC, 2006), matéria orgânica (Método 924.05; AOAC, 1990), cálcio (Método 968.08;
 189 AOAC, 2006) e fósforo (Método 946.06; AOAC, 2006). Os valores de energia bruta
 190 foram determinados no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP, por meio
 191 de calorímetro adiabático (Parr AC 6200, Moline, IL).

192 Os valores de energia metabolizável, fósforo disponível e aminoácidos digestíveis
 193 foram estimados a partir dos coeficientes propostos por Rostagno et al. (2017).

194 Os tratamentos avaliados foram os seguintes:

- 195 - Controle Negativo: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno.
- 196 - Controle Positivo: ração com antibiótico (300 ppm de lincomicina 44%)
- 197 - Limoneno: ração com limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%).

198 - Limoneno + antibiótico: ração com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%)
199 + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

200

201 Para a fabricação das dietas, primeiramente foi realizada a mistura da ração controle
202 negativo. Subsequentemente, foram adicionadas as pré-misturas com os
203 microingredientes de antibiótico, limoneno e inerte, para formação dos tratamentos. Para
204 evitar contaminação entre as dietas, utilizou-se a seguinte ordem de mistura: controle
205 negativo, limoneno, limoneno + antibiótico e por fim, antibiótico. Tanto o antibiótico
206 quanto o limoneno foram incluídos nas rações às custas do inerte. O antibiótico utilizado
207 foi a lincomicina 44%, fornecido pela empresa Sauvet[®] Indústria Farmacêutica e
208 Veterinária Ltda. O limoneno utilizado foi fornecido na forma líquida pela empresa
209 Grasp[®] Indústria e Comércio Ltda (D-limoneno 99%) e microencapsulado para uso nas
210 rações, resultando em D-limoneno 12,38% em grânulos.

211 O balanço eletrolítico da dieta (BED) foi calculado com base nos níveis de Na, K e
212 Cl dos alimentos e dos aminoácidos contidos nas rações, conforme proposto por Mongin
213 (1981), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$214 \quad \text{BED} = (\text{Na}/23,00 + \text{K}/39,10 - \text{Cl}/35,45) \times 10$$

215 onde:

216 Na = quantidade de sódio presente em cada um dos alimentos, expresso em mg/kg.

217 K = quantidade de potássio presente em cada um dos alimentos, expresso em mg/kg.

218 Cl = quantidade de cloro presente em cada um dos alimentos, expresso em mg/kg.

219

220 2.4. Microencapsulação do D-limoneno 99%

221

222 O processo de microencapsulação e as análises do material microencapsulado
223 foram realizadas no Núcleo de Estudos em Produtos Naturais da UEM – NEPRON. Para
224 inclusão do limoneno nas rações, foi previamente realizada a microencapsulação por meio
225 de equipamento spray dryer (B-191, Büchi Spray Dryer). A microencapsulação do D-
226 Limoneno foi realizada segundo metodologia de Chranioti et al. (2015), com
227 modificações, sendo que as concentrações dos produtos empregados estão descritas na
228 Tabela 2.

229 O D-Limoneno 99%, na forma de óleo foi utilizado na proporção de 1:4 m/m com
230 a Maltodextrina 1920, sob agitação constante até completa dissolução. Para facilitar o
231 processo, foi adicionado o surfactante Tween 80. A mistura foi levada ao shaker por 30

232 minutos a 35°C e 200 rpm. A dispersão homogênea foi alimentada ao spray dryer
233 (temperatura do ar de entrada de 176°C e de saída de 100°C).

234

235 Tabela 2. Concentração de produtos empregados na microencapsulação do D-Limoneno
236 99%.

Produto	Porcentagem (%)
D-Limoneno 99% (óleo)	5,00
Maltodextrina 1920	20,00
Tween 80	1,00
Água destilada	74,00
Total	100,00

237

238 O produto em pó resultante foi acondicionado em refrigerador (4°C), na ausência
239 de luz, até as análises laboratoriais e posterior uso nas rações. Como análises físico-
240 químicas no microencapsulado (Tabela 3), foi determinada a granulometria, seguindo a
241 metodologia de Zanotto e Bellaver (1996). Os teores de umidade, solubilidade e
242 higroscopicidade foram determinados pela metodologia de Chranioti et al. (2015). A
243 atividade de água foi determinada em equipamento AquaLab Series 4TE, com
244 temperatura controlada em 25°C. O teor de lipídeos totais foi determinado por meio de
245 arraste com éter de petróleo, em equipamento Soxhlet.

246 A quantidade de óleo encapsulado foi determinada gravimetricamente. As
247 microcápsulas secas foram trituradas em um dispersor, por dois minutos, na presença de
248 diclorometano. Após a trituração das partículas, foi adicionado sulfato de sódio para
249 remover a água residual. O material foi filtrado a vácuo, o filtrado foi transferido para
250 balão de fundo redondo e rotaevaporado para eliminação do solvente orgânico. A
251 eficiência de encapsulação foi definida como a quantidade de óleo recuperada por grama
252 de microcápsula em relação ao óleo inicialmente inserido. Todas as análises foram feitas
253 em triplicata.

254 Também foi determinada a concentração de compostos fenólicos totais (equivalente
255 ácido gálico) e as análises de sequestro do radical 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e
256 do Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) no D-Limoneno 99%
257 e no microencapsulado, ambas no Laboratório de Espectrofotometria e Cromatografia do
258 Departamento de Zootecnia da UEM.

259

260 Tabela 3. Características físico-químicas e atividade antioxidante do D-Limoneno-99% e
 261 do microencapsulado contendo 5% de Limoneno.

Variável	D-Limoneno (99%)	Microencapsulado
Granulometria (μm)	-	218,31
Umidade (%)	0,10	3,46
Solubilidade (%)	1,42	93,21
Higroscopicidade (g H ₂ O/100g)	0,13	12,68
Atividade de água	<0,01	0,17
Lipídeos totais (%)	99,90	12,38
Eficiência de encapsulação (%)	-	64,40
Fenóis totais (μg EAG/mg de amostra)	109,16	8,23
ABTS (mmol equiv. trolox/mg amostra)	2210,58	340,87
DPPH (% de inibição)	88,15	14,32

262

263 A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o reagente
 264 FolinCiocalteu (Souza et al., 2007). Por meio de uma curva de calibração de ácido gálico
 265 é possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presente na
 266 amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico. A curva padrão de
 267 ácido gálico foi preparada com concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. As amostras de D-
 268 limoneno e de microencapsulado foram diluídas em metanol. Para a reação, uma alíquota
 269 de 0,3 mL da solução metanólica foi adicionada a 2,5 mL de solução aquosa do reagente
 270 FolinCiocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. Incubou-se a mistura
 271 durante 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a absorbância foi medida
 272 em espectrofotômetro UV/Vis na região do visível (700 nm). O branco foi obtido
 273 substituindo-se o volume de amostra por metanol, mantendo-se as mesmas quantidades
 274 de reagente de Folin Ciocalteu e solução de carbonato de sódio. Os resultados foram
 275 expressos em μg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ μg de amostra.

276 Para o ensaio ABTS, a solução foi preparada de acordo com Re et al. (1999)
 277 reagindo-se a solução estoque de ABTS (7 mmol L^{-1}) com uma solução de persulfato de
 278 potássio ($2,45 \text{ mmol L}^{-1}$). A solução final foi deixada em repouso no escuro à temperatura
 279 ambiente durante 12-16 horas antes da utilização. O valor de absorbância entre 0,75 e
 280 0,80 em 730 nm foi determinado diluindo-se 10 mL da solução estoque com
 281 aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) (Serpen et al., 2012).
 282 Os resultados foram comparados com uma curva padrão preparada com ácido 6-hidroxi-

283 2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) e expressos como mmol de equivalente
 284 Trolox / mg de amostra. Para todas as leituras de DPPH e ABTS, foi utilizado
 285 espectrofotômetro UV-visível (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10uv Scanning).

286 Para o ensaio de sequestro do radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995), a reação
 287 de mistura consistiu em 290 µl de DPPH em metanol (0.3 mM) e 10 µL de amostra.
 288 Foram mensuradas em absorbância de 515 nm por 30 minutos. A percentagem de inibição
 289 do DPPH em 515 nm foi calculada por meio da seguinte equação:

290

$$291 \quad \% \text{ Inibição DPPH}_{(515\text{nm})} = (1 - A_f / A_0) \times 100$$

292

293 Em que:

294 A_0 : absorbância da solução de DPPH mensurada no tempo zero

295 A_f : absorbância de cada amostra 30 minutos após a adição da solução de DPPH.

296

297 2.5. Indução de artrite

298

299 Os animais foram pesados aos 7 dias de idade e separados em 2 grupos para
 300 distribuição justa de peso corporal, mantendo a proximidade do peso médio entre os
 301 grupos. Ainda assim, os animais da mesma leitegada foram distribuídos entre o grupo de
 302 indução com adjuvante completo de Freund e o grupo de aplicação do soro fisiológico,
 303 para ser considerado o efeito materno.

304 Metade dos animais utilizados no experimento (32 leitões fêmeas) foi submetida à
 305 aplicação de adjuvante completo de Freund, ainda durante a fase de aleitamento. Foi
 306 realizada a indução de artrite na articulação tarso-falange do membro posterior direito,
 307 através de injeção intradérmica de 0,1 mL de adjuvante completo de FREUND
 308 (*Mycobacterium tuberculosis* derivadas de cepa humana H37Rv e inativadas pelo calor,
 309 suspensas em óleo mineral 0,5% (w/v)) (Pearson & Wood, 1963).

310 A outra metade dos animais (n=32) foi submetida ao mesmo manejo, porém com
 311 aplicações de soro fisiológico (0,9%). Durante o período de lactação, todos os animais
 312 receberam ração pré-inicial I (Tabela 4), a partir dos 7 dias de idade, e água à vontade.

313

314 Tabela 4. Composição centesimal, química e energética da ração pré-inicial I.

Ingredientes	g/kg de matéria natural
--------------	-------------------------

Milho grão	370,00
Farelo de soja	230,00
Núcleo Pré-inicial ^{1,2}	400,00
Composição calculada	
Energia metabolizável (Mcal/kg)	3,40
Proteína bruta (g/kg)	177,50
Lactose (g/kg)	72,88
Fibra bruta (g/kg)	20,41
Fibra em detergente neutro (g/kg)	103,52
Fibra em detergente ácido (g/kg)	42,41
Cálcio (g/kg)	8,03
Fósforo disponível(g/kg)	4,05
Sódio (g/kg)	3,52
Potássio (g/kg)	2,83
Cloro (g/kg)	4,51
Lisina digestível (g/kg)	13,51
Met+Cis digestível (g/kg)	7,42
Metionina digestível (g/kg)	3,90
Treonina digestível (g/kg)	7,91
Triptofano digestível (g/kg)	2,21

315 ¹ Composição básica do produto: Soja integral desativada, Proteína concentrada de soja, Milho Pré-
316 gelatinizado, Soro de leite em pó, Gordura vegetal hidrogenada, Calcário calcítico, Fosfato bicálcico,
317 Cloreto de sódio, Filito, Sulfato de cobalto, Sulfato de cobre, Sulfato de ferro, Iodato de cálcio, Óxido de
318 manganês, Selenito de sódio, Óxido de zinco, Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina K3,
319 Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina B12, Ácido fólico, Ácido nicotínico, Ácido
320 pantotênico, Cloreto de colina, Biotina, Aditivo acidificante, Aditivo aromatizante, Aditivo antioxidante,
321 Aditivo enzimático, L-lisina, DL-metionina, L-treonina, L-triptofano, L-valina e Açúcar.

322 ² Níveis de garantia/kg do produto: Proteína bruta: 160 g (mín.), Extrato etéreo: 50 g (mín.), Fibra bruta:
323 25 g (máx.), Cálcio: 13 / 17 g (mín. / máx.), Fósforo: 7.000 mg (mín.), Sódio: 7.000 mg (mín.), Matéria
324 mineral: 130 g (máx.), Cobalto: 2 mg (mín.), Cobre: 375 mg (mín.), Ferro: 375 mg (mín.), Iodo: 4,5 mg
325 (mín.), Manganês: 137 mg (mín.), Selênio: 1 mg (mín.), Zinco: 6.780 mg (mín.), Vitamina A: 31.200 UI
326 (mín.), Vitamina D3: 6.250 UI (mín.), Vitamina E: 100 UI (mín.), Vitamina K3: 7,5 mg (mín.), Vitamina
327 B1: 7,5 mg (mín.), Vitamina B2: 12,5 mg (mín.), Vitamina B6: 7,5 mg (mín.), Vitamina B12: 150 mcg
328 (mín.), Ácido fólico: 1,5 mg (mín.), Ácido nicotínico: 87,5 mg (mín.), Ácido pantotênico: 55 mg (mín.),
329 Colina: 1.670 mg (mín.), Biotina: 0,25 mg (mín.), Lisina: 18 g (mín.), Metionina: 8.200 mg (mín.).

330

331

332 2.6. Avaliação do desempenho e características de carcaça

333

334 Todos os animais foram desmamados aos 21 dias de idade e alojados
335 individualmente em baias de creche. Todos os animais receberam ração e água à vontade
336 e iguais condições de manejo durante todo o período experimental (21 aos 36 dias de
337 idade). Os animais foram pesados no início e no final do experimento e as rações
338 experimentais sempre que fornecidas, para calcular o consumo diário de ração (CDR), o
339 ganho de peso diário (GPD) e a conversão alimentar (CA).

340 No último dia do experimento, foram mensuradas a espessura de toucinho (ET) e a
341 profundidade de músculo (PM), quando os animais atingiram o peso médio de $8,24 \pm 0,36$
342 kg por meio de uma ecocâmara (Aloka® SSD-500 Vet) e uma probe de 11,5 cm e 3,5
343 MHz. As medidas foram realizadas na região P2, entre a última e penúltima costela
344 torácica, a 4 cm da linha média, sendo a região previamente depilada no sentido crânio-
345 caudal e dorso-ventral, conforme descrito por Dutra Jr. et al. (2001), obtendo-se duas
346 imagens da região, mensuradas por meio do software Image Pro Plus®.

347

348 2.7. Avaliações morfológicas e temperatura superficial

349

350 Ao longo dos dias de avaliação, os animais foram pesados e foram tomadas as
351 medidas do perímetro e diâmetro da articulação tarso-falange do membro posterior
352 direito. Para tanto, o perímetro foi obtido com auxílio de fita métrica graduada em
353 centímetros, enquanto o diâmetro foi mensurado com auxílio de paquímetro digital,
354 expressando-se os valores em termos absolutos (cm) e de maneira alométrica, em valores
355 relativos (cm/kg PV).

356 Também foram registradas as medidas de volume do membro posterior direito dos
357 animais, utilizando-se uma proveta graduada com capacidade de 250 mL, que foi
358 preenchida com água até a superfície (V1). Em seguida, o membro foi submerso até a
359 altura da articulação tarso-tíbia (jarrete), sendo retirado suavemente e mensurado o
360 volume de água restante na proveta (V2). Assim, o volume do membro foi calculado
361 como: Volume (mL) = $V1 - V2$, sendo expresso em termos absolutos (mL) e de maneira
362 alométrica, em valores relativos (mL / kg Peso Vivo).

363 A temperatura superficial do membro posterior direito dos animais foi registrada
364 por meio de um equipamento Termovisor Fluke® (Modelo Ti-110), com termômetro
365 infravermelho acoplado. Foram obtidas 2 imagens por animal a cada dia de avaliação,
366 sendo que as imagens termográficas foram posteriormente analisadas por meio do
367 software SmartView®, em que foram tomadas as medidas de temperatura de 10 pontos

368 em cada membro e calculadas as médias de temperatura superficial, expressas em °C, para
369 posteriores análises estatísticas.

370

371 2.8. Variáveis bioquímicas do sangue

372

373 No último dia do experimento, após 6 horas de jejum, foram colhidas amostras de
374 sangue de um animal por unidade experimental, para determinação dos parâmetros
375 bioquímicos plasmáticos (glicose, ureia, proteínas totais, globulinas, triglicerídeos,
376 colesterol total, HDL e LDL), utilizando kits comerciais específicos e seguindo os
377 procedimentos descritos nos mesmos. As amostras de sangue foram obtidas através da
378 punção na veia cava anterior, com auxílio de agulhas descartáveis de 40x12 mm (Moreno
379 et al., 1997). Foram colhidos aproximadamente 20 mL de sangue que foram divididos em
380 tubos devidamente identificados contendo fluoreto, utilizado como anticoagulante nos
381 tubos destinados à análise de glicose, ou heparina sódica, para as análises dos demais
382 parâmetros bioquímicos supracitados. As amostras foram centrifugadas (3.000 rpm por
383 15 minutos) para obtenção do plasma. Em seguida, 3 mL de plasma foram transferidos
384 com auxílio de uma pipeta automática para tubos de polipropileno devidamente
385 identificados.

386

387 2.9. Parâmetros hematológicos

388

389 Foram feitos esfregaços sanguíneos com amostras de sangue colhidas em tubos
390 contendo heparina sódica, para posterior determinação dos parâmetros hematológicos
391 sanguíneos, por meio da contagem diferencial leucocitária (leucograma). Os esfregaços
392 foram realizados em lâminas de vidro, que foram coradas pelo método May Grunwald-
393 Giemsa, para posterior observação em microscópio óptico (Motic®, ds 300, Xiemen,
394 China) com objetiva de imersão (1000x). Nesta metodologia, 100 leucócitos de cada
395 lâmina de sangue foram examinados e contados utilizando o aplicativo MsCounter2,
396 possibilitando o cálculo e determinação da porcentagem de cada um dos leucócitos
397 básicos.

398 A determinação da contagem total de leucócitos foi realizada em hemocitômetro
399 (câmara de Neubauer), por meio de observação em microscópio óptico (Motic®, ds 300,
400 Xiemen, China) com objetiva de imersão (1000x), após diluição de amostras de sangue
401 em diluente específico (líquido de Turk), na proporção de 1:20.

402 Adicionalmente, foram utilizados tubos contendo EDTA para a colheita de sangue,
403 que foi utilizado para determinar a porcentagem de hematócrito, utilizando
404 microcapilares submetidos à centrifugação do sangue (10.000 rpm, por cinco minutos).

405

406 2.10. Avaliações de estresse oxidativo no plasma

407

408 Foram realizadas as análises de sequestro do radical 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil
409 (DPPH) e do Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) no plasma
410 sanguíneo, ambas no Laboratório de Espectrofotometria e Cromatografia do
411 Departamento de Zootecnia da UEM.

412 Para o ensaio de sequestro do radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995), a reação
413 de mistura consistiu em 290 µl de DPPH em metanol (0.3 mM) e 10 µL de amostra (as
414 amostras de plasma foram diluídas quando necessário). Foram mensuradas em
415 absorbância de 515 nm por 30 minutos. A porcentagem de inibição do DPPH em 515 nm
416 foi calculada por meio da seguinte equação:

$$417 \quad \% \text{ Inibição DPPH}_{(515\text{nm})} = (1 - A_f / A_0) \times 100$$

418 Em que:

419 A₀: absorbância da solução de DPPH mensurada no tempo zero

420 A_f: absorbância de cada amostra 30 minutos após a adição da solução de DPPH.

421

422 Para o ensaio ABTS, a solução foi preparada de acordo com Re et al. (1999)
423 reagindo-se a solução estoque de ABTS (7 mmol L⁻¹) com uma solução de persulfato de
424 potássio (2,45 mmol L⁻¹). A solução final foi deixada em repouso no escuro à temperatura
425 ambiente durante 12-16 horas antes da utilização. O valor de absorbância entre 0,75 e
426 0,80 em 730 nm foi determinado diluindo-se 10 mL da solução estoque com
427 aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) (Serpen et al., 2012).
428 Os resultados foram comparados com uma curva padrão preparada com ácido 6-hidroxi-
429 2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) e expressos como mmol de equivalente
430 Trolox / mL de plasma. Para todas as leituras de DPPH e ABTS, foi utilizado
431 espectrofotômetro UV-visível (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10uv Scanning).

432 As análises de glutathiona reduzida (GSH), tióis e proteínas carboniladas foram
433 realizadas no Laboratório de Metabolismo Hepático, no Departamento de Bioquímica da
434 UEM. A GSH foi determinada em lisados de hemácias, utilizando-se kit comercial
435 (OxiSelect™ Total Glutathione (GSSG/GSH) Assay Kit, CAT-312, Cellbiolabs Inc.) por

436 meio do ensaio enzimático com a enzima glutathiona redutase, na presença de
437 nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Posteriormente um cromógeno
438 presente no kit comercial foi adicionado para reagir com grupamento tiol da GSH que foi
439 lido em espectrofotômetro, a 405nm. Os procedimentos de cálculo para as concentrações
440 de GSH foram realizados conforme descritos no kit comercial.

441 Os níveis plasmáticos de tióis totais foram determinados utilizando o DTNB (ácido
442 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico), conforme descrito por Faure e Lafond (1995). A diferença
443 de absorbância inicial e final foi utilizada para calcular a concentração de tióis reduzidos
444 e os valores foram expressos como ηmol de tióis.mg de proteína⁻¹.

445 O conteúdo de proteínas carboniladas, tanto para plasma quanto para fígado, foi
446 determinado pelo método do 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), como descrito por Levine
447 *et al.* (1990). O conteúdo de proteínas carboniladas foi calculado com base no coeficiente
448 de extinção molar de 22 mM/cm, e os resultados expressos em nmol de grupamentos
449 carbonil/mg de proteína. O conteúdo proteico (proteínas totais, albumina e globulinas) foi
450 determinado de acordo com Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina como padrão.

451

452 2.11. Análise estatística

453

454 O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para avaliar a presença de *outliers*
455 entre as variáveis. A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de
456 variâncias entre os tratamentos para as diversas variáveis foram avaliadas previamente
457 utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk e de Levene (SAS, 2010), respectivamente.

458 A análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio do procedimento “*General*
459 *Linear Models*” (GLM) do software estatístico SAS (2010). Para as variáveis de
460 desempenho, o peso inicial dos suínos foi utilizado como covariável. Foi aplicado o teste
461 F para comparação das médias de animais com ou sem artrite induzida e o teste de SNK
462 para comparação das médias entre os tratamentos. Os graus de liberdade referentes aos
463 dias de avaliação pós-desmame foram desdobrados em polinômios ortogonais, para
464 obtenção das equações de regressão, conforme o melhor ajustamento. Para todas as
465 análises foi adotado o nível de significância (P) de 0,05.

466

467 3. Resultados

468

469 3.1. Desempenho

470

471 Não houve interação ($P>0,05$) entre a indução de artrite e o uso de limoneno e/ou
 472 antibiótico para nenhuma variável de desempenho zootécnico (Tabela 5). Entretanto,
 473 houve efeito isolado da indução de artrite sobre o peso inicial ($P= 0,048$), peso final ($P=$
 474 $0,023$), ganho de peso diário ($P= 0,039$) e conversão alimentar ($P= 0,041$), em que os
 475 animais artríticos apresentaram os piores resultados para todas as variáveis.

476

477 Tabela 5. Variáveis de desempenho de leitões desmamados, com ou sem artrite induzida
 478 por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.

Variáveis ¹	Artrite ²		Tratamentos ³				EPM ⁴	P-valor		
	Não	Sim	Cont. Neg.	Cont. Pos.	Lim.	Lim + Antib.		Art*Trat	Art	Trat
PI (kg) ⁵	5,921 ^A	5,452 ^B	5,812	5,783	5,750	5,924	0,096	-	0,048	-
PF (kg) ⁵	8,412 ^A	8,053 ^B	7,021 ^c	8,713 ^a	7,901 ^b	8,618 ^a	0,112	0,186	0,023	0,018
GPD (kg) ⁵	0,188 ^A	0,156 ^B	0,164	0,178	0,161	0,179	0,007	0,133	0,039	0,262
CDR (kg)	0,293	0,275	0,246	0,260	0,241	0,247	0,008	0,487	0,665	0,204
CA ⁵	1,541 ^B	1,749 ^A	1,537	1,474	1,559	1,365	0,079	0,163	0,041	0,731
PL (cm)	1,32	1,29	1,24	1,32	1,26	1,33	0,068	0,491	0,321	0,227
ET (cm)	0,24	0,21	0,20	0,21	0,22	0,22	0,007	0,143	0,510	0,233

479 1- PI: peso inicial; PF: peso final; GPD: ganho de peso diário; CDR: consumo diário de ração; CA:
 480 conversão alimentar; PL: profundidade de lombo; ET: espessura de toucinho.

481 2- NÃO: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita,
 482 aos 7 dias de idade; SIM: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na
 483 articulação tarso-falange direita, aos 7 dias de idade.

484 3- Cont. Neg.: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; Cont. Pos.: ração com antibiótico (300 ppm
 485 de lincomicina 44%); Lim.: ração com limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%); Lim. + Antib.: ração
 486 com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%) + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

487 4- Erro padrão da média.

488 5- Letras maiúsculas distintas na linha, para Artrite, indicam diferença entre as médias pelo Teste F.

489 6- Letras minúsculas distintas na linha, para Tratamentos, indicam diferença entre as médias pelo teste de
 490 SNK.

491

492 Foi observado efeito dos tratamentos sobre o peso final ($P= 0,018$), em que o
 493 Controle positivo (8,713 kg) e o Limoneno+Antibiótico (8,618kg) resultaram em valores
 494 superiores ao Limoneno (7,901 kg), que foi superior ao Controle negativo (7,021 kg).

495

496 3.2. Variáveis bioquímicas do sangue

497

498 Não houve interação ($P>0,05$) entre indução de artrite e uso de limoneno e/ou
 499 antibiótico para nenhum parâmetro bioquímico plasmático (Tabela 6). Houve efeito ($P=$
 500 0,046) da indução de artrite sobre globulinas totais, em que a média dos animais artríticos
 501 (2,46 g/dL) foi superior à média dos não artríticos (2,23 g/dL).

502

503 Tabela 6. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de leitões desmamados, com ou sem
 504 artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e
 505 antibiótico.

Variáveis ¹	Artrite ²		Tratamentos ³				EPM ⁴	P-valor		
	Não	Sim	Cont. Neg.	Cont. Pos.	Lim.	Lim + Antib.		Art*Trat	Art	Trat
GLIC (mg/dL)	86,82	81,00	86,68	85,77	79,77	83,42	2,200	0,225	0,230	0,738
UREIA (mg/dL)	21,68	22,90	21,22	23,27	23,16	21,58	1,044	0,994	0,582	0,860
PTNS (g/dL)	4,96	5,07	5,03	4,84	5,02	4,95	0,092	0,278	0,599	0,545
ALB (g/dL)	2,71	2,63	2,73	2,60	2,66	2,68	0,033	0,205	0,292	0,576
GLOB (g/dL) ⁴	2,23 ^B	2,46 ^A	2,29	2,26	2,37	2,27	0,029	0,311	0,046	0,417
TRIG (mg/dL)	57,29	55,50	57,64	53,04	56,38	58,12	2,288	0,742	0,685	0,871
COL (mg/dL)	88,43	87,82	87,14	90,50	87,96	86,96	2,687	0,761	0,903	0,979
HDL (mg/dL)	29,20	27,42	29,40	26,72	27,66	29,25	0,905	0,900	0,366	0,697
LDL (mg/dL)	41,54	40,12	41,54	39,91	40,65	41,04	2,434	0,909	0,802	0,996

506 1- GLIC: glicose; PTNS: proteínas totais; ALB: albumina; GLOB: globulinas; TRIG: triglicerídeos; COL:
 507 colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

508 2- NÃO: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita,
 509 aos 7 dias de idade; SIM: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na
 510 articulação tarso-falange direita, aos 7 dias de idade.

511 3- Cont. Neg.: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; Cont. Pos.: ração com antibiótico (300 ppm
 512 de lincomicina 44%); Lim.: ração com limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%); Lim. + Antib.: ração
 513 com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%) + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

514 4- Erro padrão da média.

515 5- Letras maiúsculas distintas na linha, para Artrite, indicam diferença entre as médias pelo Teste F.

516 6- Letras minúsculas distintas na linha, para Tratamentos, indicam diferença entre as médias pelo teste de
 517 SNK.

518

519 3.4. Parâmetros hematológicos

520

521 Não houve interação ($P>0,05$) entre a indução de artrite e o uso de limoneno e/ou
 522 antibiótico para nenhuma variável de contagem leucocitária e hematócrito dos leitões
 523 (Tabela 7). Foi observado efeito ($P= 0,022$) da indução de artrite sobre a concentração de

524 leucócitos totais, e sobre a relação Neutrófilos:Linfócitos (P=0,027), em que animais
525 artríticos apresentaram valores médios superiores aos não artríticos.

526

527 Tabela 7. Contagem leucocitária e hematócrito de leitões recém-desmamados, com ou
528 sem artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e
529 antibiótico.

Variáveis ¹	Artrite ²		Tratamentos ³				P-valor			
	Não	Sim	Cont. Neg.	Cont. Pos.	Lim. Lim.	Lim + Antib.	EPM ⁴	Art*Trat	Art	Trat
LEU (x10 ³ /μL)	16,08 ^B	23,37 ^A	20,35	18,05	19,01	17,58	1,892	0,415	0,022	0,254
NEU (%)	17,35	19,74	22,61	15,58	19,77	16,17	1,504	0,246	0,461	0,388
LIN (%)	50,78	50,07	46,38	53,25	47,08	55,50	2,174	0,881	0,885	0,369
MON (%)	2,35	3,88	3,77	2,67	3,69	2,36	0,414	0,480	0,185	0,620
EOS (%)	4,61	6,85	5,61	6,42	4,85	6,50	0,704	0,499	0,108	0,861
BAS (%)	24,91	19,59	21,61	22,08	24,61	19,67	1,761	0,287	0,143	0,742
NEU:LIN	0,31 ^B	0,39 ^A	0,48	0,27	0,43	0,30	0,041	0,581	0,027	0,179
HEM (%)	26,25	29,56	28,95	29,21	25,15	29,03	0,911	0,309	0,182	0,268

530 1- LEU: leucócitos totais; NEU: neutrófilos; LIN: linfócitos; MON: monócitos; EOS: eosinófilos; BAS:
531 basófilos; NEU:LIN: relação neutrófilos:linfócitos; HEM: hematócrito.

532 2- NÃO: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita,
533 aos 7 dias de idade; SIM: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund[®] na
534 articulação tarso-falange direita, aos 7 dias de idade.

535 3- Cont. Neg.: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; Cont. Pos.: ração com antibiótico (300 ppm
536 de lincomicina 44%); Lim.: ração com limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%); Lim. + Antib.: ração
537 com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%) + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

538 4- Erro padrão da média.

539 5- Letras maiúsculas distintas na linha, para Artrite, indicam diferença entre as médias pelo Teste F.

540 6- Letras minúsculas distintas na linha, para Tratamentos, indicam diferença entre as médias pelo teste de
541 SNK.

542

543 3.5. Perfil oxidativo plasmático

544

545 Houve interação (P=0,043) entre a indução de artrite e os tratamentos para ABTS
546 (Tabela 8). O desdobramento revelou que os tratamentos com limoneno e com
547 limoneno+antibiótico resultaram em capacidade antioxidante total (ABTS) no plasma de
548 leitões artríticos similares aos leitões não artríticos (Tabela 9).

549 Houve efeito isolado da indução de artrite sobre o GSH (P=0,032), Tióis (P=0,021)
550 e Proteínas carboniladas (P=0,011), cujas concentrações médias de GSH e Tióis foram

551 inferiores para animais com artrite induzida, enquanto o teor de Proteínas carboniladas
552 foi superior.

553

554 Tabela 8. Parâmetros oxidativos plasmáticos de leitões recém-desmamados, com ou sem
555 artrite induzida por adjuvante, alimentados com rações contendo ou não limoneno e
556 antibiótico.

Variáveis ¹	Artrite ²		Tratamentos ³				EPM ⁴	P-valor		
	Não	Sim	Cont. Neg.	Cont. Pos.	Lim.	Lim + Antib.		Art*Trat	Art	Trat
ABTS (mmol equiv. trolox/mL plasma)	13,33	9,04	10,02	11,26	12,11	11,85	0,913	0,043	0,008	0,117
DPPH (% de inibição)	7,29	6,83	7,28	6,92	7,15	6,76	0,521	0,142	0,098	0,921
GSH (nmol/mg proteína) ^{5,6}	15,95 ^A	11,36 ^B	11,23	12,85	15,21	13,12	1,021	0,251	0,032	0,201
Tióis (nmol/mg proteína)	488,3 ^A	315,7 ^B	338,2	365,6	402,2	381,7	5,51	0,321	0,021	0,361
Proteínas carboniladas (nmol/mg proteína)	5,24 ^B	6,20 ^A	6,46 ^a	5,25 ^b	5,09 ^b	5,03 ^b	0,423	0,165	0,011	0,007

557 1- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS: Ácido 2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico);
558 GSH: glutatona reduzida.

559 2- NÃO: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita,
560 aos 7 dias de idade; SIM: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na
561 articulação tarso-falange direita, aos 7 dias de idade.

562 3- Cont. Neg.: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; Cont. Pos.: ração com antibiótico (300 ppm
563 de lincomicina 44%); Lim.: ração com limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%); Lim. + Antib.: ração
564 com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%) + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

565 4- Erro padrão da média.

566 5- Letras maiúsculas distintas na linha, para Artrite, indicam diferença entre as médias pelo Teste F.

567 6- Letras minúsculas distintas na linha, para Tratamentos, indicam diferença entre as médias pelo teste de
568 SNK.

569

570 Tabela 9. Desdobramento da interação para capacidade antioxidante total (ABTS) no
571 plasma de leitões desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante, alimentados
572 com rações contendo ou não limoneno e antibiótico.

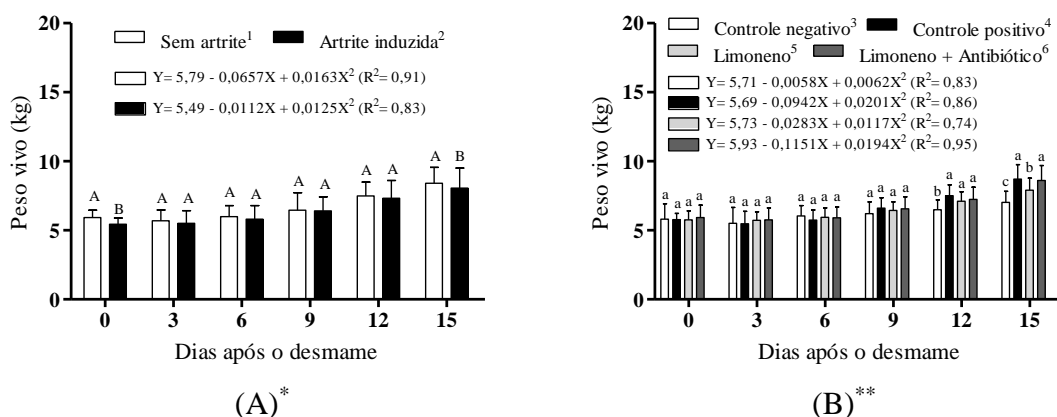
Variável ¹	Artrite ²	Tratamentos ³			EPM ⁴	
		Cont. Neg.	Cont. Pos.	Lim. + Antib.		
	Não	12,02 ^A	12,26 ^A	15,14 ^A	13,98 ^A	0,832

ABTS (mmol equiv. trolox/mL plasma)	Sim	7,08 ^B	8,18 ^B	13,11 ^A	11,15 ^A	1,021
-------------------------------------	-----	-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	-------

573 1- ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico);
 574 2- NÃO: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita,
 575 aos 7 dias de idade; SIM: Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na
 576 articulação tarso-falange direita, aos 7 dias de idade.
 577 3- Cont. Neg.: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; Cont. Pos.: ração com antibiótico (300 ppm
 578 de lincomicina 44%); Lim.: ração com limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%); Lim. + Antib.: ração
 579 com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%) + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).
 580 4- Erro padrão da média.
 581 5- Letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferença entre as médias pelo Teste F.
 582

583 3.6. Peso vivo, Temperatura superficial e Avaliação morfológica

584
 585 Considerando a influência da indução na fase de aleitamento, o peso vivo (Figura
 586 1-A) no dia do desmame e no 15º dia, foi inferior para animais com artrite induzida
 587 (P<0,05).



588 **Figura 1.** Peso vivo (kg) de leitões desmamados, com ou sem artrite induzida por
 589 adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em
 590 diferentes dias de avaliação pós-desmame.

591 ¹Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
 592 de idade; ²Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange
 593 direita, aos 7 dias de idade; ³Controle negativo: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; ⁴Controle
 594 positivo: ração com antibiótico (300 ppm de lincomicina 44%); ⁵Limoneno: ração com limoneno (500 ppm
 595 de D-limoneno 12,38%); ⁶Limoneno+Antibiótico: ração com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%)
 596 + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

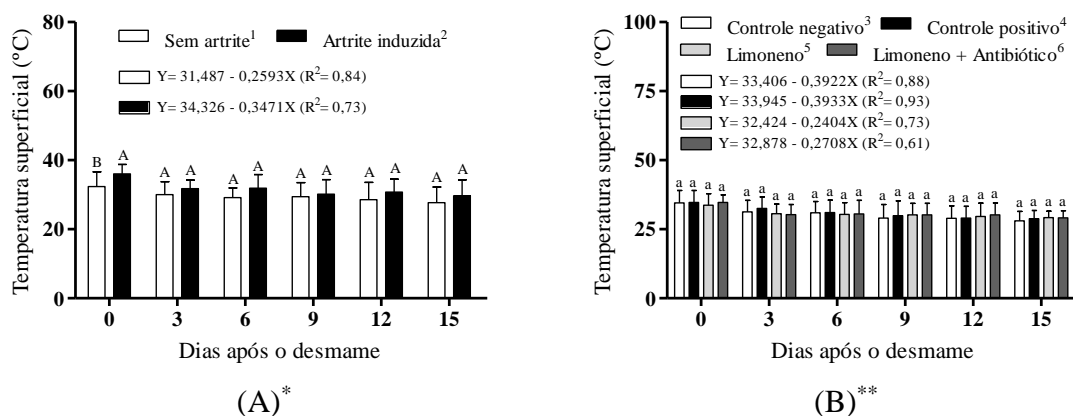
597 *Letras maiúsculas distintas entre os protocolos, para o mesmo dia de avaliação, indicam diferença entre as
 598 médias pelo teste F (P<0,05); **Letras minúsculas distintas entre os tratamentos, para o mesmo dia de
 599 avaliação, indicam diferença entre as médias pelo teste de SNK (P<0,05).

600

601 Considerando a influência dos tratamentos sobre o peso vivo (Figura 1-B), os
 602 animais do grupo Controle negativo apresentaram, a partir do 12º dia pós-desmame, peso

603 vivo inferior aos demais tratamentos ($P<0,05$). Já aos 15 dias pós-desmame, os grupos
604 Controle positivo e Limoneno+Antibiótico resultaram no maior peso vivo ($P<0,05$).

605 A temperatura superficial da articulação (Figura 2-A) foi superior para os animais
606 artríticos no dia do desmame ($P<0,05$), enquanto para os diferentes tratamentos (Figura
607 2-B) não houve diferenças ($P>0,05$) ao longo dos dias de avaliação pós-desmame. Tanto
608 para a avaliação entre protocolos de indução de artrite quanto para tratamentos, houve
609 queda linear dos valores médios de temperatura superficial da articulação ao longo dos
610 dias de avaliação, representada pelas equações de regressão expressas nas figuras.



611 **Figura 2.** Temperatura superficial (°C) do membro posterior direito de leitões recém-
612 desmamados, com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações
613 contendo ou não limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-
614 desmame.

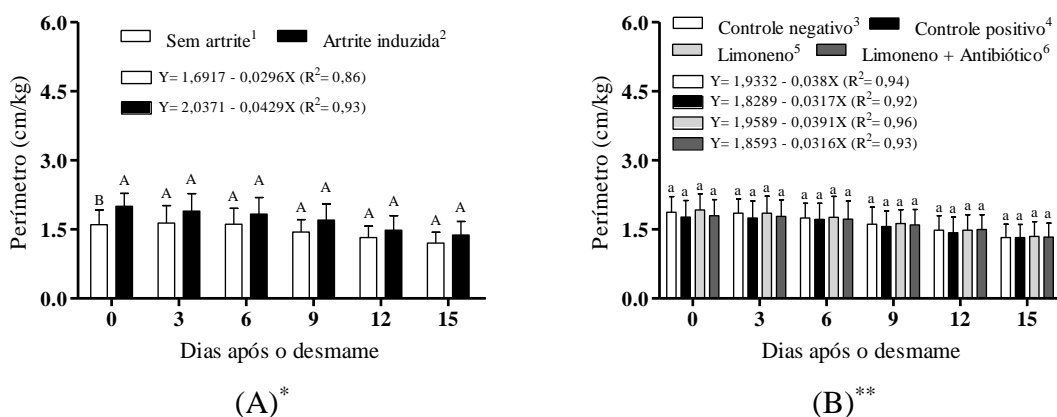
615 ¹Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
616 de idade; ²Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange
617 direita, aos 7 dias de idade; ³Controle negativo: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; ⁴Controle
618 positivo: ração com antibiótico (300 ppm de lincomicina 44%); ⁵Limoneno: ração com limoneno (500 ppm
619 de D-limoneno 12,38%); ⁶Limoneno+Antibiótico: ração com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%)
620 + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

621 *Letras maiúsculas distintas entre os protocolos, para o mesmo dia de avaliação, indicam diferença entre as
622 médias pelo teste F ($P<0,05$); **Letras minúsculas distintas entre os tratamentos, para o mesmo dia de
623 avaliação, indicam diferença entre as médias pelo teste de SNK ($P<0,05$).

624

625 Na avaliação morfológica ao longo dos 15 dias pós-desmame, o perímetro da
626 articulação (Figura 3-A) foi superior para os animais artríticos no dia do desmame
627 ($P<0,05$), enquanto para os diferentes tratamentos (Figura 3-B) não houve diferenças
628 ($P>0,05$) ao longo dos dias de avaliação pós-desmame. Tanto para a avaliação entre
629 protocolos de indução de artrite quanto para tratamentos, houve queda linear dos valores
630 médios de perímetro articular ao longo dos dias de avaliação, representada pelas
631 equações de regressão expressas nas figuras.

632

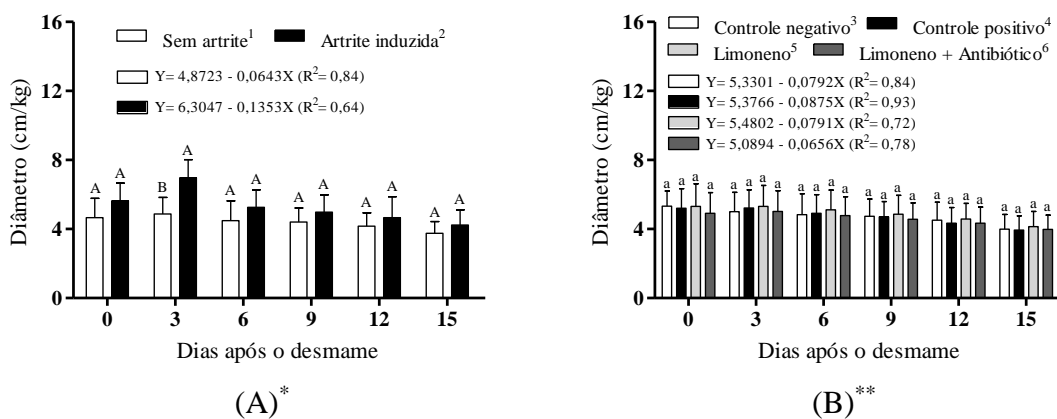


633 **Figura 3.** Perímetro (cm/kg) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados,
 634 com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não
 635 limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame.

636 ¹Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
 637 de idade; ²Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange
 638 direita, aos 7 dias de idade; ³Controle negativo: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; ⁴Controle
 639 positivo: ração com antibiótico (300 ppm de lincomicina 44%); ⁵Limoneno: ração com limoneno (500 ppm
 640 de D-limoneno 12,38%); ⁶Limoneno+Antibiótico: ração com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%)
 641 + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

642 *Letras maiúsculas distintas entre os protocolos, para o mesmo dia de avaliação, indicam diferença entre as
 643 médias pelo teste F ($P < 0,05$); **Letras minúsculas distintas entre os tratamentos, para o mesmo dia de
 644 avaliação, indicam diferença entre as médias pelo teste de SNK ($P < 0,05$).
 645

646 O diâmetro da articulação (Figura 4-A) foi superior para os animais artríticos aos
 647 3 dias após o desmame ($P < 0,05$), enquanto para os diferentes tratamentos (Figura 4-B)
 648 não houve diferenças ($P > 0,05$) ao longo dos dias de avaliação pós-desmame. Tanto para
 649 a avaliação entre protocolos de indução de artrite quanto para tratamentos, houve queda
 650 linear dos valores médios de diâmetro articular ao longo dos dias de avaliação,
 651 representada pelas equações de regressão expressas nas figuras.



652 **Figura 4.** Diâmetro (cm/kg) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados,
 653 com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não
 654 limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame.

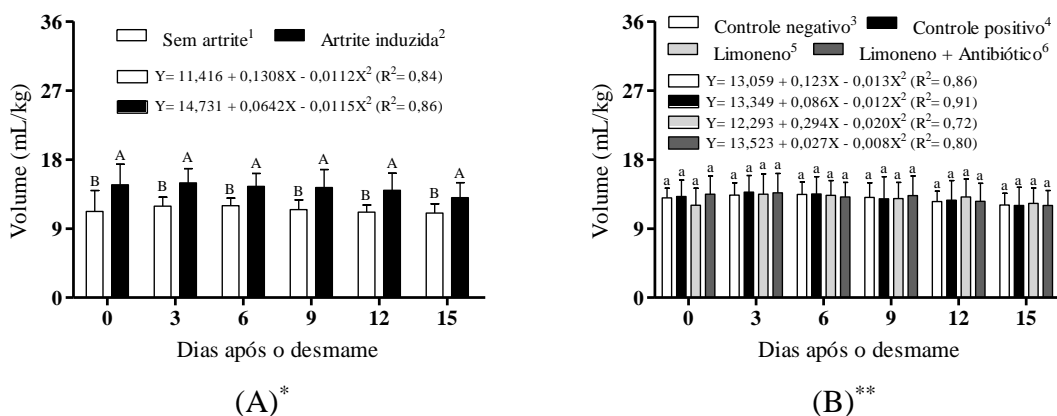
655 ¹Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
 656 de idade; ²Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund® na articulação tarso-falange
 657 direita, aos 7 dias de idade; ³ Controle negativo: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; ⁴ Controle
 658 positivo: ração com antibiótico (300 ppm de lincomicina 44%); ⁵ Limoneno: ração com limoneno (500 ppm
 659 de D-limoneno 12,38%); ⁶ Limoneno+Antibiótico: ração com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%)
 660 + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

661 *Letras maiúsculas distintas entre os protocolos, para o mesmo dia de avaliação, indicam diferença entre as
 662 médias pelo teste F (P<0,05); **Letras minúsculas distintas entre os tratamentos, para o mesmo dia de
 663 avaliação, indicam diferença entre as médias pelo teste de SNK (P<0,05).
 664

665 O volume da articulação (Figura 5-A) foi superior para os animais artríticos em
 666 todos os dias de avaliação pós-desmame (P<0,05), enquanto para os diferentes
 667 tratamentos (Figura 5-B) não houve diferenças (P>0,05) ao longo dos dias de avaliação
 668 pós-desmame. Tanto para a avaliação entre protocolos de indução de artrite quanto para
 669 tratamentos, houve comportamento quadrático com ponto de máxima para os valores
 670 médios de volume da articulação ao longo dos dias de avaliação, representada pelas
 671 equações de regressão expressas nas figuras.

672 De modo geral, a indução de artrite na fase de aleitamento resultou em
 673 manifestação da doença logo após o desmame, fato confirmado pelas variáveis de
 674 desempenho, parâmetros morfológicos, bioquímicos, hematológicos e de estado
 675 oxidativo no sangue dos leitões. O uso do Limoneno microencapsulado (500 ppm de D-
 676 limoneno 12,38%) ou de Limoneno microencapsulado + Antibiótico (250 ppm de D-
 677 limoneno 12,38% + 150 ppm de lincomicina 44%) não resultou em melhoras sobre o
 678 desempenho, porém mitigou os efeitos do estresse oxidativo em animais na fase pós-
 679 desmame com artrite induzida na fase de lactação.

680



681 **Figura 5.** Volume (mL/kg) do membro posterior direito de leitões recém-desmamados,
682 com ou sem artrite induzida por adjuvante (A), alimentados com rações contendo ou não
683 limoneno e antibiótico (B) em diferentes dias de avaliação pós-desmame.

684 ¹Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Soro Fisiológico (0,9%) na articulação tarso-falange direita, aos 7 dias
685 de idade; ²Aplicação subcutânea de 0,1 mL de Adjuvante Completo de Freund[®] na articulação tarso-falange
686 direita, aos 7 dias de idade; ³Controle negativo: ração sem adição de antibiótico ou de limoneno; ⁴Controle
687 positivo: ração com antibiótico (300 ppm de lincomicina 44%); ⁵Limoneno: ração com limoneno (500 ppm
688 de D-limoneno 12,38%); ⁶Limoneno+Antibiótico: ração com limoneno (250 ppm de D-limoneno 12,38%)
689 + antibiótico (150 ppm de lincomicina 44%).

690 *Letras maiúsculas distintas entre os protocolos, para o mesmo dia de avaliação, indicam diferença entre as
691 médias pelo teste F (P<0,05); **Letras minúsculas distintas entre os tratamentos, para o mesmo dia de
692 avaliação, indicam diferença entre as médias pelo teste de SNK (P<0,05).
693

694

695 **4. Discussão**

696

697 As artrites são inflamações articulares causadas principalmente por infecção
698 bacteriana decorrente de manejo sanitário ou profilático inadequados, que acometem
699 principalmente os leitões, causando atraso no crescimento, descarte precoce, formação de
700 animais refugos, óbitos ou condenação de carcaças nos abatedouros (Hill, 1992; Morés et
701 al., 2000; Alberton et al., 2003).

702 Houve queda no desempenho de animais artríticos (P<0,05), que apresentaram peso
703 inicial, peso final e ganho de peso diário e CA piores do que os animais não artríticos.

704 Na produção de suínos, os antibióticos são comumente utilizados para reduzir a
705 possibilidade de contaminações por microrganismos patógenos, visando prevenir
706 infecções, inflamações, diarreia e perda de desempenho dos leitões desmamados. De
707 maneira geral, são utilizados em doses sub-terapêuticas na maioria das fases de produção
708 (Gong et al., 2014). No entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos tem causado
709 preocupações quanto à saúde pública e dos animais, pela presença de resíduos de
710 antibiótico em produtos de origem animal e o desenvolvimento e propagação de cepas
711 resistentes (Thacker, 2013; Cao et al., 2019).

712 Restrições quanto ao uso dos antibióticos melhoradores de desempenho têm sido
713 feitas ao longo dos anos em diferentes países. No ano 2006, a União Europeia banuiu o uso
714 desses medicamentos para essa finalidade (Huang et al., 2015). No Brasil, algumas
715 moléculas já foram proibidas nas últimas décadas incluindo o sulfato de colistina e a
716 tilosina (BRASIL, 2016). Encontrar uma nova alternativa eficaz aos antibióticos é um

717 desafio na produção de suínos, especialmente na fase de desmame, em que enfermidades
718 com artrites ou diarreias são mais evidentes.

719 Neste sentido, produtos com alto teor de polifenóis e flavonoides despertam
720 interesse devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, com enorme
721 potencial de prevenção ou mitigação de artrites em suínos. As principais fontes de
722 compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, ou seus resíduos
723 industriais, após a extração do suco (Davis, 2004).

724 Óleos essenciais são exemplos de aditivos alimentares que podem aprimorar a
725 defesa imunológica dos suínos durante situações críticas, elevando a defesa antioxidante
726 não enzimática e auxiliando no *status* sanitário do organismo (Franz et al., 2010).
727 Tartrakoon et al. (2009) avaliaram a inclusão de um blend com óleo cítrico, cravo e menta,
728 na dieta de leitões recém-desmamados e observaram melhora na resposta imune e no
729 desempenho dos animais.

730 Nesse estudo, o Limoneno + Antibiótico (250 ppm de D-limoneno 12,38% + 150
731 ppm de lincomicina 44%) resultou em peso final similar ($P < 0,05$) ao tratamento Controle
732 Positivo (300 ppm de lincomicina 44%), sendo ambos superiores ao tratamento com
733 Limoneno (500 ppm de D-limoneno 12,38%), que por sua vez foi superior ao tratamento
734 Controle Negativo (Tabela 5). Esse resultado sugere que uma dieta de transição, composta
735 por metade da dose de antibiótico + metade da dose de óleo essencial de laranja pode
736 surtir resultados mais satisfatórios do que a substituição de todo antibiótico por limoneno.

737 O processo inflamatório causado pela artrite é uma resposta biológica complexa dos
738 glóbulos brancos e proteínas do sistema imunológico do corpo que oferece proteção
739 contra estímulos prejudiciais, infecções, patógenos e células danificadas, podendo surgir
740 de forma assintomática (Majumdar et al., 2018). A artrite e outros casos inflamatórios
741 podem causar reações indesejáveis na fisiologia dos eritrócitos, alterando o perfil de
742 componentes bioquímicos e células de defesa no sangue. Nesse estudo, a concentração
743 de globulinas totais superior no plasma de leitões artríticos é indicativo de ativação do
744 sistema de defesa imunológica. As globulinas são classificadas em três tipos: alfa, beta e
745 gama. As globulinas alfa incluem as lipoproteínas de alta densidade (HDL), as beta
746 incluem as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as gamaglobulinas são denominadas
747 anticorpos ou imunoglobulinas, produzidas pelos linfócitos B, um subconjunto de células
748 imunes, responsáveis pela função imune humoral do corpo. De modo geral, as
749 imunoglobulinas atuam reconhecendo os microrganismos patogênicos através dos
750 receptores específicos e neutralizando por meio de mecanismos diversos (Willard, 2000).

751 Dentre os testes realizados no sangue, a contagem leucocitária é uma ferramenta
752 rápida de avaliação objetiva do estado imunológico dos animais. Os leucócitos, linfócitos,
753 monócitos, neutrófilos e eosinófilos são as principais células de defesa do organismo e
754 sua concentração sanguínea pode ser influenciada pelo estado nutricional, estresse
755 ambiental e desordens clínicas (Thrall, 2012; Robles-Huaynate et al., 2013).

756 Fisiologicamente, os suínos apresentam maior concentração de linfócitos do que de
757 neutrófilos. Ainda assim, fatores de estresse podem desencadear mecanismo contrário,
758 provocando o aumento na concentração de neutrófilos circulantes (Stockham e Scott,
759 2011). No presente estudo, esse comportamento foi observado para os animais com artrite
760 induzida, que resultou em diferenças na relação neutrófilo:linfócito ($P=0,027$), indicando
761 ativação do sistema imune nos animais artríticos. Entretanto, os tratamentos avaliados
762 contendo limoneno e limoneno+antibiótico não foram eficientes em reduzir quaisquer
763 variáveis hematológicas.

764 O protocolo de indução de artrite utilizado resultou em diminuição nas
765 concentrações médias de GSH e Tióis, além de aumento na concentração de Proteínas
766 carboniladas. Por se tratar de agente de defesa antioxidante, a GSH é consumida como
767 cofator no processo de redução das ERO, reduzindo sua concentração circulante. Logo,
768 o baixo valor de GSH para animais do grupo positivo demonstra que a defesa
769 antioxidante foi acionada frente ao possível aumento das ERO (Júnior et al., 1998).

770 A medida de avaliação de grupos tióis leva em consideração a concentração dos
771 compostos tióis presentes em aminoácidos e proteínas como homocisteína, cisteína,
772 cisteilglicina, glutathiona e albumina no plasma, que são compostos com potencial
773 antioxidante. Nesse sentido, Gonçalves et al. (2017) também obtiveram resultados
774 semelhantes para diminuição de grupos tióis. É provável que os animais submetidos ao
775 protocolo de indução tiveram seus grupos tióis utilizados para combater as ERO.

776 Os protocolos do grupo positivo apresentaram concentrações menores ($P<0,05$) de
777 proteínas carboniladas, cuja síntese ocorre por ação das ERO. Devido à retirada de um
778 H^+ do carbono α da proteína ocorre fragmentação e oxidação da cadeia, produzindo
779 compostos carbonilados como aldeídos, cetonas e lactamas reativas (Fedorova, Bollineni
780 & Hoffman, 2014; Vasconcelos et al., 2007). De modo geral, as ERO realizam oxidação
781 de macromoléculas como DNA, lipídeos de membrana e proteínas (Comar et al., 2013).

782 A microencapsulação do óleo de laranja e seu uso dietético para leitões artríticos,
783 em substituição parcial ou total ao antibiótico, resultou em mitigação do estresse
784 oxidativo plasmático, provavelmente pelo alto teor de polifenóis e flavonoides nesse óleo,

785 com potencial de mitigar os efeitos secundários da inflamação articular, devido às suas
786 propriedades antioxidantes.

787 Cerca de 86% dos casos de claudicação, causada por artrite em leitões, podem ser
788 diagnosticados durante as 3 primeiras semanas de vida do animal (Maksimov et al., 2017).
789 Casos como estes podem potencializar processos de dor e inapetência, influenciando
790 negativamente no processo de aleitamento e ingestão de ração pelos leitões. Leitões
791 saudáveis são de 1,1 a 1,7 kg mais pesados do que os leitões com claudicação,
792 dependendo da idade, e podem crescer até 9% mais rápido (Zoric et al., 2016).
793 Comumente, leitões artríticos apresentam dificuldade em expressar o máximo potencial
794 genético logo nas primeiras semanas de vida, justificando o menor peso corporal dos
795 animais artríticos, como observado nesse estudo.

796 Um parâmetro usado para identificação de possível processo inflamatório causado
797 pela artrite é a mensuração da temperatura superficial no local afetado. O registro
798 termográfico consiste numa ferramenta sensível à detecção de diferenças de temperatura,
799 podendo ser correlacionado a infecções e inflamações em geral, como artrites, devido ao
800 processo inflamatório elevar a temperatura do local afetado (Chanmugam et al., 2017;
801 Bhowmik et al., 2019). No presente trabalho, os tratamentos avaliados não afetaram a
802 temperatura do local induzido, porém a temperatura local foi maior no grupo artrítico,
803 logo após o desmame.

804 Leitões com inflamação articular podem chegar a apresentar temperatura superficial
805 do membro acometido de até 41,5°C (Maksimov et al., 2017), sendo que neste trabalho
806 foi observado temperatura de 34°C na região de indução da artrite, representando uma
807 diferença de aproximadamente 3°C para o grupo controle (não induzido).

808 A temperatura é elevada devido à dinâmica de processos fisiológicos envolvidos no
809 mecanismo de defesa imunológica. A inflamação causada pela artrite eleva a atividade de
810 imunoglobulinas específicas e enzimas que atuam em combate às espécies reativas de
811 oxigênio (ERO). O fato deste processo de defesa ser dinâmico e intenso, dependendo do
812 grau de inflamação, causa o primeiro sintoma que é o aumento da temperatura local,
813 justificando o resultado apresentado (Ali et al., 2015).

814 Claudicação e edema articular são os primeiros sinais clínicos mais óbvios e
815 persistentes da artrite infecciosa em leitões, sendo que até 56,9% destes problemas ocorre
816 em uma das patas traseira (Zoric et al., 2016). Outras características como deformidades
817 articulares indicativas de artrite, incluindo erosões da cartilagem, desvio ulnar dos

818 membros anteriores e até nódulos subcutâneos e alterações radiológicas, podem ocorrer
819 em casos mais graves de artrites (Andréasson et al., 2016).

820 Avaliação morfológica é um parâmetro usado para complementar a identificação
821 de possíveis distúrbios inflamatórios. Imediatamente após a infecção, a inflamação é
822 iniciada por células imunes inatas. A demanda de células inatas, como macrófagos,
823 heterótrofos, neutrófilos e muitas outras é aumentada conforme a intensidade do processo
824 inflamatório. O aumento de volume do local afetado, por exemplo, ocorre devido o
825 aumento da demanda de agentes anti-inflamatórios (Wedekind et al., 2017; Broom et al.,
826 2018; Elsheemy et al., 2019).

827 Os resultados da avaliação morfológica permitem inferir que os animais com artrite
828 induzida aos 7 dias de idade, durante a fase de lactação, apresentaram maior perímetro,
829 diâmetro e volume do membro posterior direito, local da indução. Nenhum tratamento
830 avaliado foi capaz de mitigar os efeitos dessas alterações durante os 15 dias de avaliação
831 pós-desmame. Diante do exposto, novos estudos são necessários para avaliar o uso de
832 diferentes níveis do óleo essencial de laranja para leitões artríticos, especialmente sobre
833 variáveis de estresse oxidativo e perfil inflamatório, como expressão gênica de enzimas
834 específicas ou de proteínas relacionadas à resposta inflamatória.

835

836 **5. Conclusão**

837

838 A indução de artrite por adjuvante em leitões lactentes resulta em pior peso vivo ao
839 desmame, piora no desempenho, estresse inflamatório e oxidativo, aumento da
840 temperatura superficial e das variáveis morfológicas da articulação.

841 O uso de Limoneno microencapsulado (500 ppm de D-limoneno 12,38%) ou de
842 Limoneno microencapsulado + Antibiótico (250 ppm de D-limoneno 12,38% + 150 ppm
843 de lincomicina 44%) mitigam os efeitos do estresse oxidativo em animais após o
844 desmame gerados pela artrite induzida na fase de aleitamento.

845

846 **Financiamento**

847

848 O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
849 Tecnológico – CNPq (Processo 404804/2016-0), Brasil.

850

851

852 **Conflito de interesse**

853

854 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

855

856 **Agradecimentos**

857

858 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
859 Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado do primeiro
860 autor.

861

862 **Referências**

863

864 Alberton, G.C., Bandarra, E.P., Piffer, I., Mores, M.A.Z., Pereira, M.A.C. & Yamamoto,
865 M.T., 2003. Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e físico-químico
866 das articulações de suínos artríticos no matadouro. Archives of Veterinary Science,
867 8(1), 81-91.

868 Ali, A., Welin, A., Schwarze, J.C., Svensson, M.N.D., Na, M., Jarneborn, A., Magnusson,
869 M., Mohammad Majd, Kwiecinski, J., Josefsson, E., Bylund, J., Pullerits, R. & Jin T.,
870 2015. CTLA4 Immunoglobulin but Not Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy
871 Promotes Staphylococcal Septic Arthritis in Mice. The Journal of Infectious Diseases,
872 212(8), 1308-1316.

873 Andréasson, K., Marsal, J., Månsson, B., Saxne, T., & Wollheim, F. A., 2016. Diet-
874 Induced Arthritis in Pigs: Comment on the Article by Scher et al. Arthritis &
875 Rheumatology, 68(6), 1568-1569.

876 AOAC International. 2006. Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg (VA):
877 AOAC International.

878 Bai, J., Zheng, Y., Wang, G. & Liu, P., 2016. Protective effect of D-limonene against
879 oxidative stress-induced cell damage in human lens epithelial cells via the p38
880 pathway. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1-3.

881 Bhowmik, M.K., Das, K. & Bhattacharjee, D., 2019. Temperature profile guided
882 segmentation for detection of early subclinical inflammation in arthritis knee joints
883 from thermal images. Infrared Physics & Technology, 99, 102-112.

884 Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to
885 evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, 28, 25-30.

886 BRASIL. Instrução Normativa nº 45 de 22 de novembro de 2016. Proíbe, em todo o
887 território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato
888 de colistina com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na

- 889 alimentação animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 30 nov.
890 2016. Seção 1, p. 6, 2016.
- 891 Broom, L.J. & Kogut, M.H., 2018. Inflammation: friend or foe for animal production?.
892 Poultry science, 97 (2), 510-514.
- 893 Cao, G., Tao, F., Hu, Y., Li, Z., Zhang, Y. & Deng, B., 2019. Positive effects of a
894 Clostridium butyricum-based compound probiotic on growth performance, immune
895 responses, intestinal morphology, hypothalamic neurotransmitters, and colonic
896 microbiota in weaned piglets. Food & function, 10(5), 2926-2934.
- 897 Chanmugam, A., Langemo, D., Thomason, K., Haan, J., Altenburger, E.A., Tippett, A.,
898 Kenderson, L. & Zortman, T. A., 2017. Relative temperature maximum in wound
899 infection and inflammation as compared with a control subject using long-wave
900 infrared thermography. Advances in skin & Wound care, 30(9), 406-414.
- 901 Chranioti, C., Chanioti S. & Tzia, C., 2015. Microencapsulation of steviol glycosides
902 (Stevia rebaudiana Bertoni) by a spray drying method - Evaluation of encapsulated
903 products and prepared syrups. International Journal of Food Studies, 4, 212-220.
- 904 Comar, J.F., Sá-Nakanishi, A.B., Oliveira, A.L., Wendt, M.M.N., Amado, C.A.B.,
905 Iwamoto, E.L.I., Peralta, R.M. & Bracht, A., 2013. Oxidative state of the liver of rats
906 with adjuvant-induced arthritis. Free Radical Biology and Medicine 58, 144-153.
- 907 Cross, G.M. & Edwards, M.J., 1981. The detection of arthritis in an abattoir and its public
908 health significance. Australian Veterinary Journal, 57, 153-158.
- 909 Davis, J.L., 2004. Tangerine peels may lower Cholesterol. Journal of Agricultural and
910 Food Chemistry, May 12th.
- 911 De Araújo, A.C.J., Freitas, P.R., Barbosa, C.R.S., Muniz, D.F., Rocha, J.E., Da Silva,
912 A.C.A., Oliveira-Tintino, C.D.M., Ribeiro-Silva, J., Silva, L.E., Confortin, C., Amaral,
913 W., Deschamps, C., Barbosa-Filho, J.M., Lima, N.T.R., Tintino, S.R. & Coutinho,
914 H.D.M., 2020. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the Mikania
915 cordifolia essential oil and limonene against MDR strains. Food and Chemical
916 Toxicology, 136, 111023.
- 917 Dutra Jr, W.M., Ferreira, A.S., Tarouco, J.U., Euclides, R.F., Donzele, J.L., Lopes, P.S.
918 & Cardoso, L.L., 2001. Estimativas de rendimentos de cortes comerciais e de tecidos
919 de suínos em diferentes pesos de abate pela técnica de ultra-sonografia em tempo
920 real. Revista Brasileira de Zootecnia, 30, 1243-1250.
- 921 Elsheemy, M. S., Hasanin, A. H., Mansour, A., Mehrez, S. I. & Abdel-Bary, M., 2019.
922 Etanercept improved anemia and decreased hepcidin gene expression in a rat model of
923 rheumatoid arthritis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 112, 108740.
- 924 Faure, P. & Lafond, J.L., 1995. Measurement of plasma sulphidryl and carbonyl groups
925 as a possible indicator of protein oxidation, In: Favier, A.E., Cadet, J., Kalyanaraman,
926 B., Fontecave, M., Pierre, J.L. (Eds.), Analysis of free radicals in biological systems.
927 Basel: Birkhauser Verlag, pp. 238-247.

- 928 Fedorova, M., Bollineni, R.C. & Hoffman, R., 2014. Protein carbonylation as a major
929 hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrometry*
930 *Reviews* 33, 79-97.
- 931 Ferreira, A.L.A. & Matsubara, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças
932 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica*
933 *Brasileira*, 43(1), 61-68.
- 934 Franz, C., Baser, K.H.C., Windisch, W., 2010. Essential oils and aromatic plants in
935 animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25,
936 (5), 327-340.
- 937 Gonçalves, G.A., Soares, A.A., Correa, R.C.G., Barros, L., Haminiuk, C.W.I., Peralta,
938 R.M., Ferreira, I.C.F.R. & Bracht, A., 2017. Merlot grape pomace hydroalcoholic
939 extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvante-induced
940 arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408-418.
- 941 Gong, J., Yin, F., Hou, Y. & Yin, Y., 2014. Chinese herbs as alternatives to antibiotics in
942 feed for swine and poultry production: potential and challenges in
943 application. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(2), 223-241.
- 944 Graciano, D.E., Nääs, I.A., Garcia, R.G., Caldara, F.R., Santana, M.R. & Nascimento,
945 G.R., 2014. Identificação de artrite em suíno utilizando imagem termográfica. *Boletim*
946 *de Indústria Animal* 71(1), 79-83.
- 947 Hill, M., 1992. Skeletal System and feet. In: Leman A., Straw, B.E., Mengeling, W.L.,
948 D’Allaire, S. & Taylor, D.J., 1992. (Orgs). *Diseases of Swine*. 7th ed. Iowa: Iowa State
949 University Press, 163-195.
- 950 Huang, C., Song, P., Fan, P., Hou, C., Thacker, P. & Ma, X., 2015. Dietary sodium
951 butyrate decreases postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and
952 changing the bacterial communities in weaned piglets. *The Journal of*
953 *nutrition*, 145(12), 2774-2780.
- 954 Jayaraman, B., & Nyachoti, C. M. (2017). Husbandry practices and gut health outcomes
955 in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*, 3(3), 205-211.
- 956 Júnior, A.A.J., Chiarello, P.G., Bernardes, M.S.M., Vannucchi, H., 1998. Peroxidação
957 Lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e vitamina E. *Medicina (Ribeirão Preto)*
958 31, 3, 434-449.
- 959 Khan, M.M., Iqbal, M., Hanif, M.A., Mahmood, M.S., Naqvi, S.A., Shahid, M. & Jaskani,
960 M.J., 2012. Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. *Journal of*
961 *Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 972-979.
- 962 Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B.,
963 Shaltiel, S. & Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively
964 modified proteins. *Methods of Enzymology*, 186, 464-478.
- 965 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement
966 with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193(1), 265-275.

- 967 Madec, F. & Fourichon, C., 1990. Les facteurs de risque en epidemiologie
968 animale. *Epidémiol. Santé Anim*, 18, 31-43.
- 969 Majumdar, P., Das, K., Nath, N. & Bhowmik, M.K., 2018. Detection of Inflammation
970 from temperature profile using Arthritis knee joint Datasets. In 2018 IEEE
971 International Conference on Healthcare Informatics (ICHI) (pp.409-411). IEEE.
- 972 Maksimov, V.I., Parakhnevich, A.V., Parakhnevich, A.A., Glagoleva, T.I. & Kutafina,
973 N.V., 2017. Physiological reaction of erythrocytes' micro rheological peculiarities in
974 milk fed piglets after the negative impact of the environment. *Annual Research &
975 Review in Biology*, 1-8.
- 976 Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent
977 fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of
978 AOAC International*, 85, 1217-1240.
- 979 Mongin, P., 1981. Recent advances in dietary cation-anion balance: applications in
980 poultry. *Proceedings of the Nutrition Society*, 40, 285-294.
- 981 Moreno, A.M., Sobestiansky, J., Lopez, A.C. & Sobestiansky, A.A.B., 1997. Colheita e
982 processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico. *Embrapa
983 Suínos e Aves-Documentos - INFOTECA-E*.
- 984 Morés, N., Pierosan, R., Amaral, A.L. & Barioni Júnior, W., 2003. Fatores de risco
985 associados com artrites em suínos de abate. *Arquivo Brasileiro de Medicina
986 Veterinária e Zootecnia*, 55, 528- 532.
- 987 Morés, N., Sobestiansky, J., Barioni Junior, W., Madec, F., Dalla Costa, O.A., Paiva,
988 D.P., Lima, G.M.M., Amaral, A.L., Perdomo, C.C. & Coimbra, J.B.S., 2000. Fatores
989 de risco associados aos problemas dos leitões na fase de creche em rebanhos da região
990 sul do Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52, 191-199.
- 991 Moya, S.L., Boyle, L.A., Lynch, P.B. & Arkins, S., 2008. Effect of surgical castration on
992 the behavioural and acute phase responses of 5-day-old piglets. *Applied Animal
993 Behaviour Science*, 111(1-2), 133-145.
- 994 Murali, R., Karthikeyan, A. & Saravanan, R., 2013. Protective effects of D-limonene on
995 lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats.
996 *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 112 (3), 175-181.
- 997 National Research Council, 2012. Nutrients requirement of swine, 11th edition. The
998 Nacional Academic Press, Washington, DC.
- 999 Ozturk, B., Winterburn, J. & Gonzalez-Miquel, M., 2019. Orange peel waste valorisation
1000 through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering
1001 Journal*, 151, 107298.
- 1002 Pearson, C.M., & Wood, F.D., 1963. Studies of arthritis and other lesions induced in rats
1003 by the injection of mycobacterial adjuvant. *American Journal of Pathology* 42(1), 73-
1004 95.

- 1005 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C.,
1006 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization
1007 assay. *Free Radical Biology Medicine*, 26, 1231-1237.
- 1008 Robles-Huaynate, R.A, Thomaz, M.C, Santana, A.E, Masson, G.C.I.H, Amorim, A.B,
1009 Silva, S.Z, Ruiz, U.S, Watanabe, P.H & Budiño, F.E.L., 2013. Efeito da adição de
1010 probiótico em dietas de leitões desmamados sobre as características do sistema
1011 digestório e do desempenho. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 14, 248-
1012 258.
- 1013 Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Hannas, M.I., Donzele, J.L., Sakomura, N.K., Perazzo,
1014 F.G., Saraiva, A., Abreu, M.L.T., Rodrigues, P.B., Oliveira, R.F., Barreto, S.L.T. &
1015 Brito, C.O., 2017. *Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Foods and*
1016 *Nutritional Requirements*. 4th ed. Viçosa (MG): UFV.
- 1017 Rubiano, K., Cárdenas, J. & Ciro Velásquez, H.J., 2015. Evaluación de las propiedades
1018 termodinámicas y térmicas del d-limoneno encapsulado mediante secado por
1019 aspersión.
- 1020 SAS Institute. 2010. *SAS user's guide: statistic* – Cary: Institute.
- 1021 Serpen, A., Gökmen, V. & Fogliano, V., 2012. Total antioxidant capacities of raw and
1022 cooked meats. *Meat Science*, 90, 60-65.
- 1023 Song, Z., Liu, L., Yang, Y., Sun, J., Zhao, X., Wang, W., Mao, Y., Yuan, X. & Wang,
1024 Q., 2018. Characteristics of limonene formation during microwave pyrolysis of scrap
1025 tires and quantitative analysis. *Energy*, 142, 953-961.
- 1026 Sousa, C.M.D.M., Silva, H.R., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S.D., Araújo, D.S., Cavalcante,
1027 L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S. & Chaves, M.H., 2007. Fenóis
1028 totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 30(2), 351-
1029 355.
- 1030 Stockham, S.L., Scott, M.A., 2011. *Fundamentos de patologia clínica veterinária*. Rio de
1031 Janeiro, Guanabara Koogan.
- 1032 Sun, H., Zhang, Z., Wang, Y., Li, X., Zhang, Y.Z., Jia, L.H. & Zhang, Z F., 2009. Essence
1033 oil extracted from orange peel by microwave* assisted method. *Journal of Qiqihar*
1034 *University (Natural Science Edition)*, 5.
- 1035 Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H.
1036 W., ... & Ghali, W. A., 2017. Restricting the use of antibiotics in food-producing
1037 animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and
1038 human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*,
1039 1(8), e316-e327.
- 1040 Tartrakoon, W., Tartrakoon, T., Wuthijaree, K., Chalermnan, N. & Jantasa, B., 2009.
1041 Nutrient digestibility coefficient of weaner pigs fed diets supplemented with essential
1042 oil mixtures as feed additive. *Journal of ISSAAS (International Society for Southeast*
1043 *Asian Agricultural Sciences)*, Philippines.

- 1044 Thacker, P.A., 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine
1045 production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 35.
- 1046 Thrall, M.A., 2012. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia,
1047 Lippincott, Williams & Wilkins.
- 1048 Tittiger, F. & Alexander, D.C., 1971. Studies on the bacterial flora of condemned portions
1049 from arthritic hogs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 35, 244-248.
- 1050 Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.N., Manfredini, V., Benfato, M.S.,
1051 Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e
1052 marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para
1053 sua determinação. *Química Nova*, 30(5), 1323-1338.
- 1054 Wedekind, K. J., Ruff, K. J., Atwell, C. A., Evans, J. L. & Bendele, A. M., 2017.
1055 Beneficial effects of natural eggshell membrane (NEM) on multiple indices of arthritis
1056 in collagen-induced arthritic rats. *Modern Rheumatology*, 27(5), 838-848.
- 1057 Willard, M.D. Hypoalbuminemia. In: Feldman, B.F. et al., 2000. *Schalm's Veterinary*
1058 *Hematology*. 5.ed. Philadelphia: Wilkins, 2000, 891-898.
- 1059 Zanotto, D. L., & Bellaver, C., 1996. Método de determinação da granulometria de
1060 ingredientes para uso em rações de suínos e aves. Concórdia: Embrapa-CNPSA, 1-5.
- 1061 Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I. & Gaskins, H.R., 2004. Molecular
1062 ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of*
1063 *Nutrition*, 134, 465-472.
- 1064 Zoric, M., Schmidt, U., Wallenbeck, A. & Wallgren, P., 2016. Lameness in piglets—
1065 should pain killers be included at treatment?. *Porcine health management*, 2(1), 8.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Considerando a necessidade de padronização de um método para indução de artrite em leitões, restou comprovado que a indução da doença na fase de lactação gerou inflamação articular, atraso no desenvolvimento dos animais, perda de peso, resposta inflamatória e estresse oxidativo. A aplicação do adjuvante aos 7 dias de idade pareceu ser o protocolo mais prático, devido ao baixo peso dos animais, facilidade de contenção, uso de apenas uma dose e manifestação do quadro clínico similar aos demais tratamentos com duas ou três doses.

O uso do óleo essencial microencapsulado, em dietas para leitões artríticos, em substituição parcial ou total ao antibiótico, reduziu o estresse oxidativo plasmático, provavelmente devido ao alto teor de polifenóis e flavonoides nesse óleo, com potencial de mitigar os efeitos secundários da inflamação articular, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

Ainda assim, novos estudos são necessários para avaliar o uso de diferentes níveis do óleo essencial de laranja para leitões artríticos, especialmente sobre variáveis de estresse oxidativo e perfil inflamatório, como expressão gênica de enzimas específicas ou de proteínas relacionadas à resposta inflamatória.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "POLPA CÍTRICA E ENZIMAS EXÓGENAS SOBRE O DESEMPENHO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E ESTADO OXIDATIVO DO SANGUE DE LEITÕES RECÉM DESMAMADOS, COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE", protocolada sob o CEUA nº 2086220217 (ID 001221), sob a responsabilidade de **Leandro Dalcin Castilha** e equipe; Paulo Cesar Pozza; Ricardo Souza Vasconcellos; Jurandir Fernando Comar; Gustavo Henrique de Araújo; Leonardo Felipe Malavazi Ferreira; Ana Carolina Bueno Bravin - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 09/05/2017.

We certify that the proposal "CITRUS PULP AND EXOGENOUS ENZYMES ON PERFORMANCE, BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD AND OXIDATIVE STATE OF POST-WEANING PIGLETS WITH ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS", utilizing 96 Swines (males and females), protocol number CEUA 2086220217 (ID 001221), under the responsibility of **Leandro Dalcin Castilha** and team; Paulo Cesar Pozza; Ricardo Souza Vasconcellos; Jurandir Fernando Comar; Gustavo Henrique de Araújo; Leonardo Felipe Malavazi Ferreira; Ana Carolina Bueno Bravin - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 05/09/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2017](#) a [03/2019](#) Área: [Dzo-Zootecnia](#)

Origem: [Fazenda Experimental de Iguatemi](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 45 dias](#)

N: [96](#)

Linhagem: [\(Large white x Landrace x Piétrain\)](#)

Peso: [1 a 11 kg](#)

Local do experimento: Setor de Suinocultura da Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM.

Maringá, 10 de dezembro de 2019

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Erika Seki Kioshima Cótica
Coordenadora Adjunta da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá