

Caracterização Molecular da Microbiota Intestinal em Suínos Tratados com Óleos Essenciais em Substituição a Antibióticos na Dieta

Molecular Characterization of Intestinal Microbiota in Swine Treated with Essential Oils in Substitution of Antibiotics in the Diet

RESUMO

Larissa Fernanda Quintino
Lariff.g@live.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Hilda Vanessa Poquioma Hernandez
vpoquiomah@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Jackeline Dall Agnol de Lima
jackelinedallagnol@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Patrícia Rossi
patriciarossiutfpr@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Nédia de Castilhos Ghisi
nediaghisi@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

A cadeia produtiva da suinocultura vem crescendo significativamente nos últimos anos. Com isso, a demanda por alimentos com qualidade e segurança alimentar vem aumentando. O óleo essencial é um aditivo alternativo que proporciona melhora na microbiota intestinal, consequentemente obtendo produtos de alta qualidade para o consumidor. O presente trabalho teve como objetivo padronizar o protocolo para detecção de bactérias intestinais de suínos em terminação com diferentes dietas. Foram utilizadas 19 amostras oriundas da porção do ceco dos animais em experimento com diferentes tratamentos. Os produtos da extração do DNA das amostras foram submetidos a sete temperaturas distintas de anelamento durante a amplificação *in vitro* pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Contudo, os resultados não foram satisfatórios, provavelmente devido a ineficiência do protocolo de extração do DNA ou a coleta das amostras. Mais estudos e tentativas são necessários para obtenção de um resultado mais satisfatório.

PALAVRAS-CHAVE: Suinocultura. Óleo Essencial. Reação em Cadeia da Polimerase.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The swine farming production chain has been growing significantly in recent years. As a result, the demand for food with quality and safety has been increasing. Essential oil is an alternative additive that provides improvement in the intestinal microbiota, therefore obtaining a high quality products for the consumer. This assignment aimed to standardize the protocol of detection of intestinal virus of finishing swines with different diets. Nineteen samples from the caecum section were used in an experiment with different treatments. Dna extraction results were subjected to seven different annealing temperatures during *in vitro* amplification by the polymerase chain reaction (PCR) method. However, the results were not satisfactory, probably due to the inefficiency of the dna extraction protocol or the collection of samples. Further studies and attempts are needed to obtain a more satisfactory result.

KEYWORDS: Pig Farming. Essential Oil. Polymerase Chain Reaction.

INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da suinocultura tem relevância nos âmbitos sociais e econômicos, conferindo a posição ao Brasil entre os maiores exportadores mundiais deste tipo de carne. Ainda, o Brasil se destaca em requisito carne, estando entre os maiores produtores mundiais, perdendo apenas para a China, União Europeia e Estados Unidos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2018; SILVA, 2015).

As enfermidades oriundas de microrganismos afetam estritamente a produção de carne suína, promovendo perdas produtivas e aumento de mortalidade, consequentemente afetando a lucratividade. Portanto a utilização de determinados produtos garantem a sanidade animal, proporcionando a expressão do máximo potencial produtivo (CHIQUEIRI, 2003; DANIEL, 2018).

A busca por novos promotores de crescimento em substituição aos antibacterianos vem crescendo. Dentre as alternativas, óleos essenciais que minimiza a resistência de bactérias, reduzindo problemas ocasionados pelos antibióticos, além de melhorar a palatabilidade do alimento (MAJOLO et al., 2014).

A PCR, Reação em Cadeia da Polimerase, foi um marco na Biologia Molecular considerada revolucionária, promovendo a rápida expansão de pesquisas acerca da estruturação do DNA. A técnica foi criada por Kary Banks Mullis nos meados de 1983, com finalidade de permitir obtenção de fragmentos de DNA *in vitro* a partir da oscilação de temperatura por síntese enzimática (CAMARGO; SILVA, 2019; HAAS; TORRES, 2016). Para Silva et al. (2016) a técnica possibilita otimização de análises da expressão dos genes. Além disso, infinitas possibilidades foram possíveis após a padronização e popularização desta técnica.

Há 3 etapas fundamentais durante a técnica de PCR: desnaturação do DNA, anelamento do primer e amplificação do fragmento. Primeiramente, as pontes de hidrogênio se rompem conforme o aumento da temperatura. Ao separar as fitas, há o resfriamento da solução para facilitar a ligação do primer na região complementar oposta do DNA. Posteriormente, a DNA Polimerase (Taq polimerase) adiciona as bases nitrogenadas nas cadeias de fita simples, resultando novas moléculas de DNA (ROSELINO, 2008; SILVA et al., 2016).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo de detecção de bactérias intestinais de suínos em terminação em diferentes tratamentos.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado na Empresa localizada no Estado de Santa Catarina. As análises laboratoriais foram feitas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, no Campus Dois Vizinhos. Utilizaram-se 19 amostras retiradas da porção do ceco de leitões em terminação alimentados com suplementos de óleos essenciais específicos. As amostras foram armazenadas em álcool 70%. Os tratamentos avaliados podem ser analisados na tabela 2. Por uma questão de sigilo com a empresa, mais detalhes sobre os tratamentos não podem ser fornecidos.

Tabela 1 – Tratamentos Utilizados Durante o Experimento.

Tratamento	Composição
T1	Ração Basal Sem Antibiótico (Controle)
T2	Controle + Oléo Essencial

(Fonte: Própria Autoria, 2019)

A primeira etapa realizada consistiu na extração de DNA usando o Kit Wizard Promega®. Inicialmente foi removido 20 miligramas (mg) da porção do ceco, seguido da adição de 400 µL de Nucley Lisis Solution no cadinho para a maceração do tecido. Posteriormente as amostras permaneceram em banho maria durante 30 minutos submetidas a temperatura de 65°C. Após serem retiradas foram adicionados 10 µL de Proteinase K para a degradação das proteínas emergidas na solução contendo DNA. A incubação em banho maria subsequente foi de 2 horas em 55°C. 2 µL de RNases foram adicionados para remoção de RNA na solução, em seguida, repetiu-se à fervura em banho maria à 37°C (30 minutos). Ainda, foram acrescidos 200 µL de Protein Precipitation Solution e submetidas a centrifugação por 10 minutos (12000 rpm).

Ao transferir o sobrenadante para um microtubo de 1,5 mL foram acrescidos 600 µL de Isopropanol, seguida de centrifugação por 2 minutos (12000 rpm). Repetiu-se o processo com etanol 70% (600 µL) para a purificação do DNA. Analogamente repetiu o procedimento com centrifuga á 1200 rpm. Após a remoção dos resíduos, adicionou-se 100 µL de DNA Rehydration Solution.

Para a solução do gel de agarose foram utilizados 1,5 gramas de agarose, 15 mL de tampão TBE e 135 mL de água destilada para obtenção de 1% de agarose em TBE. Inicialmente, a duração da eletroforese foi de 45 minutos à 80 volts. Para garantir uma melhor separação das bandas durante a técnica de eletroforese, o tempo de duração foi modificada para 1 hora e 25 minutos permanecendo a voltagem.

O método aplicado para a análise de PCR foi o mesmo desempenhado por WU, Y et al. (2017), correspondente aos primers rRNA 16S (41F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG; 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT). No decorrer do processo, foram testadas 7 temperaturas distintas (48°C, 50°C, 52°C, 55°C, 58°C, 60°C e 65°C). Para isso, utilizaram-se diferentes concentrações e volumes especificados na Tabela 3 e 4.

Tabela 2 – Quantidade de concentração e volume de reagentes para a técnica de PCR.

Item	Concentração	Volume
Mix	1x	22,5
Forward Primer	0,2	0,5
Reverse Primer	0,2	0,5
DNA	-	1,5
Total	-	25

(Fonte: Própria Autoria, 2019)

Tabela 3 – Quantidade de concentração e volume de reagentes de PCR modificados.

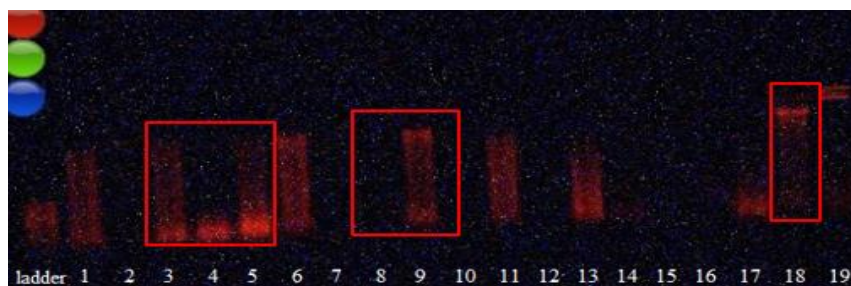
Item	Concentração	Volume
Mix	1x	45
Forward Primer	0,2	0,5
Reverse Primer	0,2	0,5
DNA	-	4
Total	-	50

(Fonte: Própria Autoria, 2019)

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, com a metodologia de extração de DNA proposta foram visualizados DNA apenas nas amostras denominadas como 3, 4, 5, 8, 9 e 18 conforme destacado na figura 1. As demais estavam degradadas ou não foi evidenciada a presença de DNA. A amostra 8 durante a foto no equipamento transluminador não foi visualizada. Possivelmente a falta de limpeza do aparato influenciou no resultado.

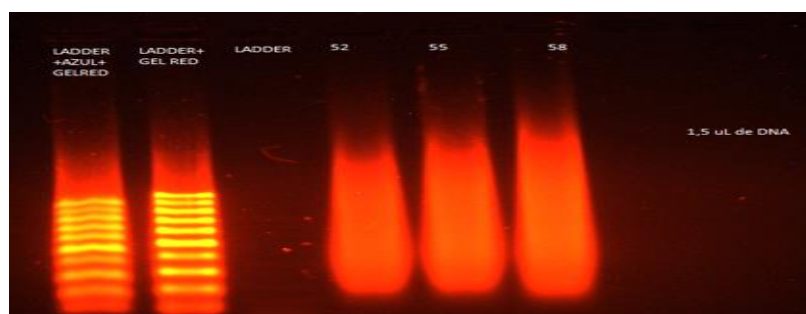
Figura 1 – Amostras de DNA (Extração de DNA).



(Fonte: Próprio Autor, 2019)

Com as diferentes temperaturas testadas durante a PCR, não obtivemos resultados satisfatórios como visto nas figuras 2 e 3. Para a visualização do Ladder foram modificados o procedimento, pois o mesmo não estava visível nos resultados da extração do DNA. Com isso, foi utilizado o Ladder (5 µL) apenas com o Gel Red® (3 µL), visto que, o mesmo com o Gel Loading Buffer não demonstrou eficiência para a quantificação de DNA.

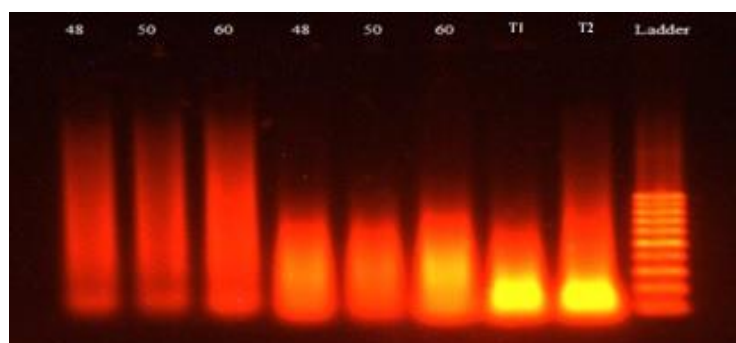
Figura 2 – Amostras oriundas de PCR e Ladder com diferentes reagentes.



(Fonte: Próprio Autor, 2019)

Embora a ineficiência do processo de PCR, a extração de DNA foi repetida para que se pudesse testar as modificações feitas no protocolo usando duas amostras com diferentes tratamentos (T1 e T2). Alguns reagentes tiveram o volume alterado, dentre eles, a Nucley Lysis Solution (600 μ L) e DNA Rehydration (70 μ L) para obter maiores concentrações de DNA na solução. O período de permanência no banho maria aumentou para 45 minutos após a adição de proteinase K. Algumas amostras tiveram 2 lavagens com etanol 70% para ter DNA mais puro. Contudo, mesmo com as alterações feitas, não foi possível visualização prévia de DNA nas amostras.

Figura 3 – Produtos Amplificados pelo Método de PCR e Extração de DNA.



(Fonte: Próprio Autor, 2019)

Provavelmente, devido a fatores externos, a amplificação não ocorreu. Dentre os motivos, a coleta do material e o período de armazenamento estarem inapropriados para obtenção de DNA, já que as amostras permaneceram por longo tempo em estoque antes das análises serem realizadas. Por sua vez, o protocolo de extração pode não estar adequado, possivelmente necessite a inclusão de alguns reagentes como Cell Lysis Solution e nitrogênio líquido no protocolo para otimizar a ruptura da parede celular das bactérias intestinais e liberação do DNA.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos ainda não foram satisfatórios, entretanto, o protocolo será modificado para que posteriormente os dados extraídos sejam utilizados e aplicados futuramente.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual de atividades 2018**. 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

CAMARGO, Cleyton Florencio de; SILVA, Paulo Roberto Queiroz da. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular**. Disponível em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORE>>

NCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>.
Acesso em: 29 jul. 2019.

CHIQUEIRI, Julien. **Probiótico E Prebiótico Na Alimentação De Suínos Em Crescimento E Terminação**. 2003. 59 f. Tese (Doutorado) - Curso de Produção Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2003.

DANIEL, Amanda Gabrielle de Souza. **Diversidade microbiana intestinal de suínos saudáveis e afetados por disenteria suína e enteropatia proliferativa**. 2018. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle. APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, [s.i.], p.1-15, jan. 2016. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5D3lu05EHeEnqPI_2017-1-12-8-29-47.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2019.

MAJOLO, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.505-512, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13_109.

ROSELINO, Ana Maria. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.187-203, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962008000300002>.

SILVA, Andressa Fernanda et al. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR. **Unilago**, [s.i.], p.1-8, 2016. Disponível em: <<http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoatual/Sumario/2016/downloads/31.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

SILVA, Apauliana Daniela Lima da. **Farelo do Bagaço de Caju na Restrição Alimentar Qualitativa para Suínos em Terminação**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, Universidade do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2015.

Wu, Y., Pan, L., Shang, Q.H., Ma, X.K., Long, S.F., Xu, Y.T., Piao, X.S. et al. Effects of isomalto-oligosaccharides as potential prebiotics on performance, immune function and gut microbiota in weaned pigs. **Animal Feed Science And Technology**, [s.l.], v. 230, p.126-135, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.013>.