



EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ÁCIDOS ORGÂNICOS MICROENCAPSULADOS NA ALIMENTAÇÃO DO LEITÃO

Crescimento, Digestibilidade, Fisiologia Digestiva

Cláudia Marina Rosa dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: Doutor João Pedro Bengala Freire

Co-orientador: Doutor Mário António Pereira Silva Soares de Pinho

Júri:

Presidente: Doutor José Pedro da Costa Cardoso Lemos, Professor Associado da
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Mário António Pereira Silva Soares de Pinho, Professor Auxiliar da
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo, Professora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2010

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Pedro Bengala Freire, meu orientador, pela sugestão do tema, pelo apoio, disponibilidade, paciência e amizade demonstrados e pelas sempre agradáveis conversas que tivemos ao longo da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Pinho, meu co-orientador, pela disponibilidade e preciosa ajuda dada na análise histológica.

Ao Sr. José António e à D. Georgina pela grande ajuda, disponibilidade e paciência demonstrados durante a parte experimental deste trabalho.

À D. Lígia, D. Cesaltina e D. Lurdes pela ajuda e simpatia prestadas durante a etapa laboratorial.

Ao meu pai por sempre me ter apoiado e dado força ao longo da realização desta tese e pela preciosa ajuda dada nos fins-de-semana do ensaio experimental.

À minha mãe e avó pelo apoio e incentivo.

À Raquel Lima pela grande amizade demonstrada e pela preciosa ajuda dada durante a fase experimental deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas zootécnicos Inês Leite, Raquel Ribeiro, Sofia Lopes, Elsa Nascimento, Ana Lúcia Pulido, Mafalda Ferreira, Isaura Gouveia, Filinto Osório, António Souza e Diogo Cunha pela amizade e apoio demonstrados nesta importante etapa da minha vida académica e pelos bons momentos passados no ISA.

Aos meus restantes amigos que de uma forma ou de outra me apoiaram.

A todos, Muito Obrigada!

Resumo

Com o objectivo de estudar o efeito de duas misturas de óleos essenciais e ácidos orgânicos microencapsulados no crescimento e função digestiva do leitão, foi realizado um ensaio com 24 leitões com cerca de 3 semanas de idade. Os leitões foram distribuídos por 3 regimes: RB (controlo), SW01 (regime base + 0,1% da mistura SW01) e SW02 (regime base + 0,1% da mistura SW02).

O peso vivo final (em kg, RB: 19,87; SW01: 23; SW02: 24), a ingestão (em g/dia, RB: 617; SW01: 725; SW02: 755) e o ganho de peso (em g/dia, RB: 388; SW01: 473; SW02: 503) tiveram tendência para ser superiores quando a mistura SW02 foi fornecida ($P < 0,10$). A digestibilidade da proteína bruta teve tendência para ser superior no grupo SW01 ($P = 0,0607$). A digestibilidade do NDF e do ADF e a largura das vilosidades do duodeno também aumentaram com a inclusão da mistura SW01 ($P < 0,05$). O comprimento do intestino grosso decresceu com a mistura SW02 ($P < 0,0413$). Verificou-se que a inclusão de ambas as misturas fez diminuir a actividade da celulase no ceco e a produção de AGV no íleo e cólon e fez aumentar a produção de AGV no ceco ($P < 0,05$).

Concluindo, não foi possível comprovar a eficácia dos aditivos estudados.

Palavras-chave: leitões, óleos essenciais, ácidos orgânicos, performances zootécnicas, digestibilidade, fermentação intestinal.

Abstract

In order to study the effect of two blends of microencapsulated essential oils and organic acids on piglet's growth and digestive function, 24 piglets with about 3 weeks of age were used in a trial. The piglets were assigned into 3 diets: RB (control), SW01 (control diet + 0.1% of the SW01 blend) and SW02 (control diet + 0.1% of the SW02 blend).

There was a tendency to increase final body weight (in kg, RB: 19.87; SW01: 23; SW02: 24), feed intake (in g/day, RB: 617; SW01: 725; SW02: 755) and weight gain (in g/day, RB: 388; SW01: 473; SW02: 503) when the blend SW02 was supplied ($P < 0.10$). There was a tendency for higher crude protein digestibility in the group SW01 ($P = 0.0607$). The digestibility of NDF and ADF as well as the villi width in the duodenum increased with the inclusion of SW01 blend ($P < 0.05$). The length of the large intestine decreased with the SW02 blend ($P < 0.0413$). The inclusion of both blends in the diet decreased the cellulase activity in the cecum and the VFA production in the ileum and colon and increased the VFA production in the cecum ($P < 0.05$).

Concluding, it was not possible to prove the effectiveness of the additives studied.

Key words: piglets, essential oils, organic acids, growth performance, digestibility, intestinal fermentation.

Extended Abstract

Weaning is a critical period for piglets that involves several stressful factors like social, environmental and nutritional changes when their immune and digestive systems are still immature. Animals become more susceptible to digestive disorders which result in low voluntary feed intake and suboptimal growth rate (Nofrarías *et al.*, 2006). To improve piglets performance at weaning subtherapeutic doses of antibiotics have been used (Walsh *et al.*, 2007b). However, public concern over development of resistant pathogen strains and antibiotic residues in animal products has led to a ban of most of the antibiotics as growth promoters by the European Union, since January 2006 (Blank *et al.*, 2001). The search for alternatives to the use of antibiotics increased and essential oils as well as organic acids have been proposed as a valid option. Microencapsulation of these feed additives has been tested since it allows their slow release along the swine gastrointestinal tract, increasing their luminal availability (Meunier *et al.*, 2006).

In order to study the effect of two blends of microencapsulated essential oils (carvacrol, eugenol and cinnamaldehyde) and organic acids (fumaric and malic) on growth performance, digestibility, development of the gastrointestinal tract, intestinal histology and intestinal fermentation, 24 piglets with about 3 weeks of age were used in a 5 week trial. The piglets were assigned into 3 diets: RB (control), SW01 (control diet + 0.1% of the SW01 blend with 42.5% of fumaric acid, 8.5% of malic acid and 3% of essential oils) and SW02 (control diet + 0.1% of the SW02 blend with 37.5% of fumaric acid, 7.5% of malic acid and 5% of essential oils). During the trial average daily feed intake and average daily weight gain were controlled. At week 2 and 4 the faeces and urine were collected for digestibility and nitrogen balance determinations. At the end of the trial the piglets were slaughtered to collect samples of stomach and intestinal contents and also samples of the small intestinal mucosa. The gastrointestinal tract development was checked according to the weight of its compounds, accessory glands and spleen. The bacterial enzymatic activity was determined in the cecum and colon contents and volatile fatty acids production was determined in the contents of ileum, cecum and colon.

The effect of both blends on growth performances was not significant ($P > 0.05$). However, there was a tendency to increase final body weight (in kg, RB: 19.87; SW01: 23; SW02: 24), feed intake (in g/day, RB: 617; SW01: 725; SW02: 755) and weight gain (in g/day, RB: 388; SW01: 473; SW02: 503) when the blend SW02 was supplied ($P < 0.10$). The piglets from SW01 group had quantitative greater dry matter (RB: 84.2%; SW01: 86.9%; SW02: 83.6%) and crude protein (RB: 81.6%; SW01: 83.0%; SW02: 77.7%) digestibility ($P < 0.10$). The digestibility of NDF (RB: 57.9%; SW01: 68.1%; SW02: 58.3%) and ADF (RB:

35.2%; SW01: 49.4%; SW02: 30.3%) showed a significant increase when the blend SW01 was incorporated in the diet ($P < 0.05$). The length of the large intestine decreased with the SW02 blend ($P < 0.0413$). Regarding gastric and intestinal pH there was no differences among the 3 diets ($P > 0.05$). As for the intestinal histology only the villi width in the duodenum was significantly affected, increasing with the inclusion of SW01 blend ($P < 0.05$). The inclusion of both blends in the diet decreased the cellulase activity in the cecum and the VFA production in the ileum and colon and increased the VFA production in the cecum ($P < 0.05$).

Concluding, the results obtained in this study cannot prove the effectiveness of the feed additives tested.

Índice Geral

1 – Introdução	1
2 – Revisão Bibliográfica	2
2.1 – A Problemática do Desmame nos Leitões.....	3
2.2 – Utilização de Óleos Essenciais na Alimentação dos Suínos.....	4
2.2.1 – Efeito da sua utilização no crescimento dos suínos.....	5
2.2.2 – Modos de acção.....	8
2.2.2.1 – Efeito antimicrobiano.....	8
2.2.2.2 – Efeito antioxidante.....	10
2.2.2.3 – Efeito na digestibilidade.....	10
2.2.2.4 – Efeito na histologia intestinal.....	13
2.3 – Utilização dos Ácidos Orgânicos Fumárico e Málico na Alimentação dos Suínos.....	14
2.3.1 – Efeito da sua utilização no crescimento dos suínos.....	15
2.3.2 – Modos de acção.....	18
2.3.2.1 – Efeito na digestibilidade.....	18
2.3.2.2 – Efeito sobre a microflora intestinal, padrão de AGV e histologia intestinal.....	19
2.4 – Microencapsulação de Óleos Essenciais e Ácidos Orgânicos.....	21
2.4.1 – Utilização em suínos.....	22
3 – Materiais e Métodos	24
3.1 – Animais.....	24
3.2 – Regimes Alimentares.....	25
3.3 – Protocolo Experimental.....	26
3.3.1 – Preparação das Amostras dos Regimes Alimentares, dos Refugos, das Fezes e das Urinas.....	28
3.4 – Análises.....	28
3.4.1 – Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis (AGV).....	28
3.4.2 – Determinação da Actividade Enzimática Microbiana.....	29
3.4.3 – Análise Histológica da Mucosa Intestinal.....	30
3.4.4 – Medição do pH dos Conteúdos do Tracto Gastrointestinal.....	30

3.4.5 – Determinações Analíticas a partir dos Regimes Alimentares, Fezes e Urina.....	30
3.5 – Parâmetros Avaliados.....	31
3.5.1 – Performances Zootécnicas.....	31
3.5.2 – Digestibilidade Fecal Aparente.....	32
3.5.3 – Balanço Azotado.....	32
3.6 – Tratamento Estatístico dos Dados.....	33
4 – Resultados.....	34
4.1 – Performances Zootécnicas.....	34
4.2 – Digestibilidade Fecal Aparente.....	36
4.3 – Balanço Azotado.....	38
4.4 – Desenvolvimento do Tracto Gastrointestinal.....	40
4.5 – Conteúdos do Tracto Gastrointestinal: determinação da matéria seca (MS) e do pH.....	41
4.6 – Morfologia da Mucosa Intestinal.....	41
4.7 – Actividade Enzimática Microbiana.....	43
4.8 – Ácidos Gordos Voláteis (AGV) nos Conteúdos Intestinais.....	44
5 – Discussão.....	47
5.1 – Performances Zootécnicas.....	47
5.2 – Digestibilidade Fecal Aparente e Balanço Azotado.....	48
5.3 – Desenvolvimento do Tracto Gastrointestinal.....	49
5.4 – pH dos Conteúdos Gastrointestinais.....	50
5.5 – Morfologia da Mucosa Intestinal.....	51
5.6 – Actividade Enzimática Microbiana e AGV nos Conteúdos Intestinais.....	52
6 – Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas.....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Efeito do uso de extractos vegetais nas performances produtivas de suínos.....	7
Tabela 2 – Efeito do uso de extractos vegetais na digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e da proteína bruta (PB) em suínos.....	12
Tabela 3 – Algumas propriedades físico-químicas dos ácidos fumárico e málico (Partanen & Mroz, 1999).....	15
Tabela 4 – Efeitos do uso dos ácidos orgânicos fumárico e málico nas performances produtivas de leitões (pós-desmame).....	17
Tabela 5 – Efeito do ácido fumárico na digestibilidade ileal aparente da matéria seca (MS), da proteína bruta (PB) e de alguns aminoácidos (AA) em leitões.....	19
Tabela 6 – Comparação entre duas misturas de ácidos orgânicos e extractos de plantas, uma microencapsulada e outra sob a forma livre, administradas a suínos (Piva <i>et al.</i> , 2007b).....	23
Tabela 7 – Composição (g/kg) dos regimes experimentais.....	25
Tabela 8 – Composição química (%) dos regimes experimentais.....	26
Tabela 9 – Índice de consistência fecal e respectivo estado das fezes.....	27
Tabela 10 – Efeito da composição do regime e do período experimental nas performances de crescimento e na consistência fecal durante o ensaio.....	35
Tabela 11 – Efeito da composição do regime experimental e do período na digestibilidade fecal aparente dos principais constituintes do regime.....	37
Tabela 12 – Efeito da composição do regime experimental e do período nos parâmetros do balanço azotado dos leitões.....	39
Tabela 13 – Efeito da composição do regime alimentar no peso do tracto gastrointestinal dos leitões ao abate (g/kg de PV).....	40
Tabela 14 – Efeito da composição do regime experimental sobre o teor de matéria seca e o pH dos conteúdos do tracto gastrointestinal dos leitões.....	41
Tabela 15 – Efeito da composição do regime experimental na morfologia da mucosa intestinal dos leitões.....	42
Tabela 16 – Efeito da composição do regime experimental na actividade das enzimas microbianas (mg/ml) nos conteúdos do ceco e do cólon dos leitões.....	43
Tabela 17 – Efeito da composição do regime experimental no teor e na proporção molar dos AGV nos conteúdos íleais.....	44
Tabela 18 – Efeito da composição do regime experimental no teor e na proporção molar dos AGV nos conteúdos do ceco.....	45
Tabela 19 – Efeito da composição do regime experimental no teor e na proporção molar dos AGV nos conteúdos do cólon.....	46

Índice de Figuras

Figura 1 – Sala de ensaio.....	24
Figura 2 – Esquema do ensaio experimental.....	27

Lista de Abreviaturas

- AA** – Aminoácidos
- ADF** – Fibra ácido-detergente
- ADL** – Lenhina ácido-detergente
- AGV** – Ácidos gordos voláteis
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BAL** – Bactérias ácido-lácticas
- C2** – Ácido acético
- C3** – Ácido propiónico
- C4** – Ácido butírico
- CMV** – Complexo mineral e vitamínico
- CRN** – Coeficiente de retenção azotada
- CUDap** – Coeficiente de utilização digestiva aparente
- CUPN** – Coeficiente de utilização prático do azoto
- DNSA** – Ácido dinitrosalicílico
- DPR** – Desvio padrão residual
- G:F** – Gain:Feed
- IC** – Índice de conversão
- IC4** – Ácido isobutírico
- IC5** – Ácido isovalérico
- INRA** – Institut National de la Recherche Agronomique
- ISA** – Instituto Superior de Agronomia
- MS** – Matéria seca
- NDF** – Fibra neutro-detergente
- NRC** – National Research Council
- PB** – Proteína bruta
- pKa** – Constante de acidez
- PV** – Peso vivo
- RB** – Regime base
- SAS** – Statistical Analysis System

SW01 – Regime suplementado com 0,1% da mistura SW01

SW02 – Regime suplementado com 0,1% da mistura SW02

1 - Introdução

O aumento da pressão económica e a intensificação da produção suína resultou numa redução da idade de desmame de 4-5 para 2-3 semanas, numa tentativa de maximizar a produtividade anual da porca (Walsh *et al.*, 2007b). O pós-desmame é uma fase crítica em que os leitões estão sujeitos a factores de stress social, ambiental e nutricional quando os seus sistemas imunitário e digestivo são ainda imaturos (Nofrarias *et al.*, 2006). Assim, os animais ficam susceptíveis à ocorrência de diversas patologias, nomeadamente distúrbios gastrointestinais. Por consequência, verifica-se um retardamento do crescimento, um aumento da mortalidade, assim como um aumento dos custos com os tratamentos médicos. Estes problemas têm sido combatidos através da inclusão de doses subterapêuticas de antibióticos no alimento, que melhoram significativamente as performances dos animais (Walsh *et al.*, 2007b). Contudo, nos últimos anos tem-se verificado uma crescente preocupação relativamente ao desenvolvimento da resistência de alguns microrganismos patogénicos aos antibióticos e à ocorrência de resíduos de antibiótico nos produtos animais, o que levou a que, desde Janeiro de 2006, a União Europeia proibisse o uso da maior parte dos antibióticos. Tornou-se assim urgente a procura de alternativas que promovessem o crescimento dos animais e ao mesmo tempo fossem seguras para o consumidor (Blank *et al.*, 2001). Entre os vários aditivos alimentares sugeridos como alternativa aos antibióticos, encontram-se os extractos vegetais e os ácidos orgânicos. Diversos estudos têm sido feitos com o intuito de mostrar que o uso de alguns óleos essenciais (Franz *et al.*, 2010, Oetting *et al.*, 2006, Utiyama, 2004, entre outros), assim como alguns ácidos orgânicos (Falkowski & Aherne, 1984, Giesting & Easter, 1985, Radecki *et al.*, 1988, entre outros) melhoram as performances de crescimento de leitões na fase do pós-desmame. Ao mesmo tempo, diversas técnicas de fabrico destes aditivos têm sido desenvolvidas com o objectivo de torná-los mais eficazes. A microencapsulação de óleos essenciais e de ácidos orgânicos permite que estes sejam libertados de forma lenta e continuada, aumentando a sua disponibilidade luminal em todas as partes do tubo digestivo, nomeadamente nos compartimentos mais terminais (Meunier *et al.*, 2006).

Este trabalho teve como objectivo aprofundar o conhecimento sobre o efeito da inclusão de óleos essenciais e ácidos orgânicos microencapsulados na ração de leitões desmamados com cerca de 3 semanas. Para tal, foram usadas duas misturas contendo diferentes quantidades de óleos essenciais, ácido fumárico e ácido málico, avaliando-se o seu efeito no crescimento, digestibilidade, desenvolvimento do tracto gastrointestinal, matéria seca e pH dos conteúdos intestinais, morfologia da mucosa intestinal e actividade fermentativa microbiana.

2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – A Problemática do Desmame nos Leitões

A intensificação da produção suína tem levado a uma diminuição da idade do desmame para as 2-3 semanas com o intuito de maximizar a produtividade anual da porca. Um dos principais problemas que afectam a rentabilidade da indústria suína é a diminuição da eficiência de produção que resulta do atraso no crescimento que ocorre aquando do desmame (Walsh *et al.*, 2007b). O desmame é uma etapa muito crítica para os leitões, uma vez que estão sujeitos a vários **factores de stress**, tais como mudanças sociais (são separados da porca), ambientais (mudam de instalações) e nutricionais (deixam de beber o leite materno, que é fornecido a cada 60-90 minutos pela porca e passam a ingerir alimento sólido *ad libitum*). Tudo isto acontece quando os seus sistemas imunitário e digestivo ainda não estão completamente desenvolvidos, isto é, a imunidade activa ainda não está desenvolvida e a secreção de enzimas digestivas, ácido clorídrico, bicarbonato e muco ainda é insuficiente (Molly, 2001, citado por Utiyama, 2004). O sistema digestivo está adaptado à digestão do leite e depois do desmame tem de adaptar-se à digestão da nova dieta. Segundo Freire (1998) devido à presença de quimosina e de um pH ácido proveniente da existência de ácido láctico microbiano, o suco gástrico está adaptado à digestão da proteína do leite desde os primeiros dias de vida. Durante o aleitamento, no intestino delgado a lactase tem uma intensa actividade, enquanto o intestino grosso ainda não tem a sua capacidade fermentativa muito desenvolvida, não podendo por isso receber grandes quantidades de produtos proteicos não digeridos nem de polissacáridos não amiláceos. Após o desmame o amido torna-se a principal fonte energética e a proteína do leite é substituída por proteínas vegetais, o que implica no leitão a uma adaptação morfológica, enzimática e metabólica (Freire, 1998).

A nível histológico verifica-se uma redução da altura das vilosidades e um aumento da profundidade das criptas no intestino delgado, resultante do baixo consumo de alimento, da presença de toxinas bacterianas e da adesão de bactérias aos enterócitos (Cera *et al.*, 1988, citados por Oetting *et al.*, 2006), o que leva a uma menor capacidade de absorção de nutrientes. Por consequência, ocorre um fornecimento de nutrientes insuficiente, um aumento da fermentação intestinal e a ocorrência de diarreias pós-desmame. A colonização do intestino delgado pelas bactérias patogénicas *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotóxicas é também muito frequente nesta fase, provocando diarreias severas, a que se dá o nome de colibacilose pós-desmame (Montagne *et al.*, 2004). Tudo isto leva a que a ingestão voluntária de alimento e a taxa de crescimento fiquem abaixo do nível ideal, verificando-se a ocorrência de várias patologias e o comprometimento da integridade da mucosa digestiva

(Pluske *et al.*, 1997, e Spreuwenberg, 2002 citados por Nofrarias *et al.*, 2006). Um desmame precoce leva a que todos estes efeitos negativos sejam agravados e, em última análise, os distúrbios digestivos, patologias e consequente atraso no crescimento levam a um aumento da mortalidade dos leitões, o que resulta em grandes perdas económicas. As diarreias representam 11% da mortalidade dos leitões na fase do pós-desmame e as diarreias causadas por *E. coli* enterotóxica são a doença entérica mais comum nos leitões, contabilizando 50% dos dez milhões de leitões que morrem anualmente em todo o mundo (Alexander *et al.*, 1994, citado por Owusu-Asiedu *et al.*, 2003). Todos estes efeitos negativos são característicos da primeira fase do pós-desmame, denominada **fase aguda**, que dura entre uma a duas semanas.

Posteriormente, ocorre a **fase adaptativa** do pós-desmame, na qual o tracto gastrointestinal do leitão começa a adaptar-se à transição de alimento líquido para alimento sólido e às características da nova dieta (Salgado *et al.*, 2002), sofrendo alterações morfológicas, fisiológicas, microbiológicas e imunitárias (Lallès *et al.*, 2007). A síntese de ácido clorídrico no estômago dá-se a partir das quatro semanas de vida, enquanto a produção de pepsina aumenta entre as duas e as cinco semanas, permanecendo depois estável. A actividade das enzimas proteolíticas do suco pancreático, da lipase pancreática, da maltase e da sacarase intestinais aumenta a partir das três semanas com a supressão do leite, acontecendo o contrário com a lactase. Com o aumento da idade também se transfere a maior proporção de ácidos orgânicos do estômago e intestino delgado, para o ceco e cólon (Manners, 1976). Assim, o animal começa a aumentar a sua ingestão de alimento e consequentemente a sua taxa de crescimento.

Todos os problemas verificados nesta fase do pós-desmame tornam a alimentação dos animais um grande desafio, uma vez que esta pode ser uma ferramenta importante para contorná-los. O uso de doses subterapêuticas de antibióticos promotores de crescimento tem sido a solução mais usada. No entanto, desde Janeiro de 2006, o seu uso foi proibido nos países integrantes da União Europeia o que tornou urgente a procura de alternativas (Blank *et al.*, 2001). Neste contexto, vários aditivos alimentares têm sido estudados quanto ao seu efeito positivo sobre as performances de crescimentos dos suínos. Entre eles podem destacar-se os probióticos, prebióticos, extractos vegetais e ácidos orgânicos.

2.2 – Utilização de Óleos Essenciais na Alimentação dos Suínos

Os extractos vegetais têm vindo a ser muito utilizados nos últimos anos como aditivos alimentares para animais de pecuária, com o intuito de aumentar a sua produtividade e melhorar a qualidade dos seus produtos (carne, leite e ovos). Podem ser classificados de acordo com a sua origem e processamento, utilizando diversos termos como ervas aromáticas, especiarias, óleos essenciais ou óleo-resinas (Windisch *et al.*, 2008).

Os **óleos essenciais** são substâncias aromáticas voláteis, que podem ser extraídas de diferentes partes da planta como, por exemplo, folhas, flores, frutos, gomos, galhos, caule, raízes e sementes. São misturas complexas de **princípios activos**, que são metabolitos secundários das plantas, principalmente terpenos, compostos fenólicos e polifenólicos, vários hidrocarbonetos, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres ou lactonas, alifáticos de baixo peso molecular (Dorman & Deans, 2000). Cada princípio activo pode ser encontrado em diversas plantas, em diferentes concentrações. O **carvacrol** está presente nos óleos essenciais extraídos de diversas espécies do género *Origanum*, sendo o maior componente do óleo do orégão (50 – 80%). Pode também ser encontrado no óleo de tomilho (9 – 60%), entre outros. O **eugenol** existe no óleo essencial extraído do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata*) em quantidades superiores a 80%, podendo igualmente ser encontrado noutras plantas, em menores quantidades. O **cinamaldeído** está presente em diferentes espécies do género *Cinnamomum*, sendo o constituinte maioritário (60 – 95%) do óleo essencial da canela (Michiels, 2009b).

Na natureza, existe uma grande variedade de óleos essenciais, com diferentes composições químicas, que lhes conferem **diferentes actividades biológicas**. A sua composição química pode ser influenciada por diversos factores como espécie e subespécie da planta, localização geográfica, época da colheita, parte da planta usada e método de isolamento (Cosentino *et al.*, 1999, Marino *et al.*, 1999, Juliano *et al.*, 2000, Faleiro *et al.*, 2002, citados por Brenes & Roura, 2010). Podem ser extraídos através de métodos como destilação a vapor, destilação com álcool ou prensagem a frio (Windisch *et al.*, 2008).

Os produtos à base de extractos vegetais, que são usados actualmente na alimentação animal, são compostos por misturas de princípios activos isolados e/ou de óleos essenciais (Utiyama, 2004). Vários estudos *in vitro* (Dorman & Deans, 2000; Michiels *et al.*, 2007; Michiels *et al.*, 2009a, entre outros) já demonstraram os diferentes modos de acção destes compostos, sendo necessários mais estudos *in vivo* para que se entenda verdadeiramente como eles actuam no organismo dos animais e também, a fim de se adequarem os níveis de inclusão e a escolha dos extractos que melhor se adequam a cada situação. A interpretação dos resultados obtidos *in vitro* deve ser feita com cuidado, assim

como a sua extrapolação para situações *in vivo*, uma vez que a capacidade de acção dos óleos essenciais vai ser influenciada por diversos factores inerentes ao funcionamento do organismo do animal, nomeadamente a possibilidade de serem ou não absorvidos pela parede intestinal.

Quanto à possível acumulação destes extractos, mais precisamente dos princípios activos, nos tecidos, o risco é mínimo, uma vez que estes são rapidamente metabolizados no organismo do animal (Kohlert *et al.*, 2000, citados por Utiyama, 2004).

2.2.1 – Efeito da sua utilização no crescimento dos suínos

Os óleos essenciais são aditivos incorporados na ração dos animais com o objectivo de melhorar as performances zootécnicas, através dos seus diferentes modos de acção. No entanto, existem ainda algumas dúvidas quanto aos seus efeitos positivos.

Em geral, os diversos estudos mencionados na tabela 1 mostram **resultados variados**. Esta variabilidade pode ser causada por diversos factores, como composição da dieta base, nível de ingestão de alimento, tipo e origem dos óleos essenciais, nível de inclusão no regime, padrões de higiene e condições ambientais (Franz *et al.*, 2010). Outros factores, como época de colheita e estado de maturidade das plantas, métodos de extracção, método e duração da conservação e armazenamento e possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas entre diferentes princípios activos, devem também ser levados em conta (Brenes & Roura, 2010).

A ingestão voluntária de alimento por parte dos animais está intimamente relacionada com a **palatabilidade** da dieta. Geralmente, aceita-se a ideia de que os extractos vegetais melhoram o cheiro e a palatabilidade da ração, o que pode resultar num aumento da ingestão. Contudo, Horton *et al.* (1991) citados por Utiyama (2004) observaram uma queda no consumo de alimento pelos suínos, quando se adicionou extracto de alho. Jugl-Chizzola *et al.* (2005) citados por Franz *et al.* (2010), também observaram um decréscimo da ingestão voluntária de alimento por parte de leitões, à medida que aumentou a inclusão de extracto de tomilho e orégão na dieta. Muitos óleos essenciais têm cheiro e sabor muito intensos e a sua inclusão leva à rejeição da ração por parte dos animais.

A melhoria dos índices de conversão, verificada em alguns estudos, pode resultar de uma melhor absorção dos nutrientes aliada a um menor gasto de energia e proteína para a manutenção do tracto digestivo, resultante da melhor saúde intestinal (Utiyama, 2004).

Dependendo da composição do extracto vegetal e do seu nível de inclusão na dieta, estes aditivos podem afectar a ingestão de alimento tanto positiva como negativamente (Utiyama, 2004).

Na tabela 1 estão sintetizados alguns efeitos resultantes da utilização de diferentes extractos de plantas (óleos essenciais e/ou princípios activos extraídos de canela, cravo-da-índia, orégão, pimento, alho, tomilho, entre outros) na performance produtiva de leitões (pós-desmame) e de suínos em fase de crescimento e engorda, referenciados por diferentes autores. Na maior parte dos estudos mencionados, verificou-se uma ligeira melhoria dos parâmetros zootécnicos, resultante da utilização dos extractos vegetais. Assim, a utilização destes aditivos resultou, em média, numa melhoria de 1% (variando entre -8 e 20%) no que diz respeito à **ingestão de alimento**, numa melhoria de 4% (variando entre -4 e 19%) quanto ao **ganho de peso** e numa melhoria de 2% (variando entre -3 e 9%) relativamente ao **índice de conversão alimentar**.

De notar que o estudo de Kong *et al.* (2007), onde foi utilizada uma mistura de extractos de plantas de origem chinesa, obteve os valores mais favoráveis, em relação à melhoria da ingestão de alimento (20%) e do ganho de peso (19%). Nos restantes estudos, as diferenças percentuais, em relação ao regime base, foram menores.

Regra geral admite-se que este tipo de aditivos exerce um efeito positivo sobre o crescimento dos suínos, através dos seus diferentes modos de acção (efeito antimicrobiano, efeito antioxidante, efeito na digestibilidade e na histologia intestinal). Contudo, é necessário fazer mais estudos para se clarificar a sua eficácia.

Tabela 1 – Efeito do uso de extractos vegetais nas performances produtivas de suínos

Animais	Extracto Vegetal ¹	Duração do Ensaio	Nível de Inclusão no Regime (g/kg)	Efeito do uso de extractos vegetais (diferença em relação à ração base)			Referência
				Ingestão de Alimento	Ganho de Peso	Índice de Conversão Alimentar	
leitões (pós-desmame)	Canela	-	0,1	105	102	97	Gollnisch <i>et al.</i> (2001) cit. in Franz <i>et al.</i> (2010)
	Cravo-da-índia		0,1	101	100	97	
	Orégão		0,1	103	102	100	
	Canela	-	0,1	95	100	105	Wald <i>et al.</i> (2001) cit. in Franz <i>et al.</i> (2010)
	Cravo-da-índia		0,1	103	107	104	
	Orégão		0,1	100	105	105	
	Pimento		0,1	92	96	105	
	Carvacrol, cinamaldeído, Capsaicina	25 dias	0,15 ou 0,3	100	100	100	Manzanilla <i>et al.</i> (2004)
	Orégão	-	0,5	97	107	109	Gunther & Bossow (1998) cit. in Franz <i>et al.</i> (2010)
	Alho, cravo-da-índia, canela, tomilho, pimenta, eugenol, cinamaldeído	35 dias	0,5	100	100	100	Utiyama (2004)
Cravo-da-índia, tomilho, orégão, eugenol, carvacrol	5 semanas	0,7; 1,4 ou 2,1	100	100	100	Oetting <i>et al.</i> (2006)	
Pó Chinês ²	4 semanas	2,0	120	119	100	Kong <i>et al.</i> (2007)	
Mistura de óleos essenciais	4 semanas	2,0	100	110	100	Hong <i>et al.</i> (2004)	
suínos em fase de crescimento e engorda	Tomilho, alecrim, orégão	16 semanas	0,1	100	105 e 108 ^a	100	Yan <i>et al.</i> (2010)
	Orégão, canela, tomilho, pimento	-	0,8 e 0,3 ^b	100	100	102	Thaler <i>et al.</i> (2004)

Legenda: < 100 – o parâmetro piorou significativamente

100 – o parâmetro não foi afectado ou não se verificaram diferenças significativas

> 100 – o parâmetro foi melhorado significativamente

¹ constituído por mistura de óleos essenciais e/ou de princípios activos

² constituído por ervas aromáticas de origem chinesa

^a dieta de baixa e alta densidade nutricional, respectivamente

^b grupo em crescimento e grupo em engorda, respectivamente

2.2.2– Modos de acção

2.2.2.1 - Efeito antimicrobiano

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais está relacionado com a sua natureza hidrofóbica, que faz com que tenham uma grande afinidade para os lípidos da membrana plasmática das bactérias. Assim, interferem com a integridade e permeabilidade da membrana, nomeadamente com diversos processos a ela associados (transporte de electrões, gradiente de iões, translocação de proteínas, fosforilação, e outras reacções dependentes de enzimas), causando a sua ruptura e conseqüente morte da célula (Dorman & Deans, 2000).

➤ Estudos *in vitro*

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm sido demonstradas em diversos estudos *in vitro* (Dorman & Deans, 2000; Michiels *et al.*, 2007; Michiels *et al.*, 2009a). Através do estudo da actividade mínima inibitória (medida padrão de poder bacteriostático) de alguns extractos de plantas, verificou-se que estes podem ser tão eficientes como alguns antibióticos, dependendo do seu nível de inclusão na dieta (Tabak *et al.*, 1991, e Kamel, 2000, citados por Utiyama, 2004).

Dorman & Deans (2000) demonstraram o forte efeito inibidor dos óleos essenciais do **cravo-da-índia**, do **tomilho** e do **orégão** contra diversos microrganismos patogénicos, como *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. Estes autores atribuíram o efeito antimicrobiano aos compostos fenólicos, como o **eugenol**, **timol** e **carvacrol**, constituintes desses óleos essenciais.

No estudo de Michiels *et al.* (2007) foi demonstrado que alguns princípios activos, componentes de óleos essenciais, como o **carvacrol**, o **timol**, o **eugenol** e o **trans-cinamaldeído** inibem o crescimento de diferentes grupos de bactérias existentes no tubo digestivo dos suínos. O **carvacrol** e o **timol** mostraram um forte efeito antimicrobiano contra bactérias coliformes, *E. coli* e *Lactobacillus spp.* O **trans-cinamaldeído** exerceu um forte efeito inibidor contra bactérias coliformes e *E. coli*, mas um fraco efeito sobre as *Lactobacillus spp.*

O óleo essencial presente na canela, contendo **cinamaldeído**, **eugenol** e **carvacrol**, apresenta efeito antimicrobiano contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter* e *Clostridium perfringens*, apresentando assim um

amplo espectro de acção bactericida (Tabak *et al.*, 1991, e Chang *et al.*, 2001, citados por Utiyama, 2004).

➤ Estudos *in vivo*

Castillo *et al.* (2006) afirmam que os extractos de plantas actuam promovendo a selecção de grupos específicos de bactérias, em vez de reduzir a população microbiana total. Nos estudos de Castillo *et al.* (2006) e de Manzanilla *et al.* (2004), foi demonstrado que o uso de uma mistura comercial de extractos de plantas contendo **carvacrol**, **cinamaldeído** e **capsaicina** (princípio activo da pimenta) aumentou a contagem de *Lactobacillus spp.* e diminuiu a contagem de enterobactérias, no jejuno e ceco de leitões recém-desmamados, resultando num aumento da razão Lactobacillus:Enterobactérias. Esta razão representa um indicador do equilíbrio intestinal, já que as bactérias *Lactobacillus spp.* são importantes para manter uma boa saúde intestinal devido à sua capacidade de controlar microrganismos patogénicos, como a *E. coli* (Blomberg *et al.*, 1993, e Canibe & Jensen, 2003, citados por Manzanilla *et al.*, 2004).

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais melhora a saúde intestinal dos animais, fazendo com que estes estejam menos expostos a toxinas microbianas ou outros metabolitos indesejáveis, como amónia e aminas biogénicas (Franz *et al.*, 2010). Num estudo de Kroismayr *et al.* (2008) citados por Franz *et al.* (2010), com leitões, em que se usou 40 mg/kg de uma mistura de **carvacrol**, **timol**, **anetol** e **limoneno**, observou-se uma redução da contagem de *E. coli* na parte final do íleo e conseqüentemente, uma menor quantidade de aminas biogénicas.

Devido ao seu efeito antimicrobiano, os extractos vegetais têm um efeito modulador sobre a população microbiana do intestino delgado, e conseqüentemente sobre a sua actividade, provocando uma alteração da quantidade e fonte de substrato que chega ao intestino grosso. Para além disso, têm também um efeito modulador sobre a microflora do próprio intestino grosso. Por estas razões, a actividade fermentativa no intestino grosso e conseqüentemente o padrão de ácidos gordos voláteis (AGV) produzido, pode sofrer alterações com o uso destes aditivos.

A higiene das carcaças é outro parâmetro que pode ser melhorado pelo efeito antimicrobiano dos óleos essenciais. Estudos mostram, que o uso do óleo essencial do orégão exerceu um efeito benéfico sobre a contagem total de bactérias, em particular de bactérias patogénicas (como a *Salmonella*), em carcaças de frangos (Aksit *et al.*, 2006, citados por Windisch *et al.*, 2008).

2.2.2.2 - Efeito antioxidante

De acordo com Windisch *et al.* (2008), os óleos essenciais das plantas da família Labiatae (menta, alecrim, orégão, tomilho) têm sido alvo de grande interesse devido às suas capacidades antioxidantes. No caso do alecrim, estas capacidades derivam dos compostos fenólicos **ácido rosmarínico** e **rosmanol**. O tomilho e o orégão têm também elevadas propriedades antioxidantes, devido aos monoterpenos **timol** e **carvacrol** (Cuppert e Hall, 1998, citados por Windisch *et al.*, 2008). A elevada actividade antioxidante de compostos como o timol e o carvacrol, deve-se principalmente às propriedades redox dos seus grupos fenólicos OH (Frag *et al.*, 1989a, citados por Brenes & Roura, 2010).

As propriedades antioxidantes dos óleos essenciais protegem os lípidos alimentares da oxidação. Este aspecto tem sido muito estudado no que diz respeito a alimentos para humanos e animais de companhia, sendo necessária mais pesquisa na área da alimentação de suínos (Windisch *et al.*, 2008).

Alguns dos compostos antioxidantes presentes nos óleos essenciais ingeridos com a ração, ficam retidos nos músculos e continuam activos após o abate dos animais, conferindo maior estabilidade oxidativa à carcaça, à carne e à gordura (aumenta o prazo de validade dos produtos) (Utiyama, 2004).

Apesar do que foi referido, são necessários mais estudos *in vivo* para se comprovar e compreender melhor a actividade antioxidante dos óleos essenciais.

2.2.2.3 - Efeito na digestibilidade

Foi demonstrado que o uso de extractos de plantas como aditivos alimentares pode resultar na estimulação de secreções digestivas (saliva, suco gástrico, suco pancreático, biliar e muco) e na estimulação da actividade enzimática, melhorando assim a digestibilidade dos alimentos (Platel & Srinivasan, 2004). Utiyama (2004) diz que o aumento da digestibilidade dos alimentos, verificado em alguns estudos onde foram adicionados extractos vegetais ao regime de leitões, pode ser explicado não só pela estimulação da actividade enzimática, mas também pela alteração da morfologia e tamanho dos órgãos e pelo combate a microrganismos patogénicos. Em particular, este combate contra os microrganismos patogénicos (efeito antimicrobiano), que resulta numa redução da adesão das bactérias e da produção de toxinas pelas mesmas, leva a uma maior protecção do epitélio intestinal, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes. Com a redução da população microbiana, há também uma menor produção de metabolitos secundários

resultantes da sua actividade, como as aminas biogénicas. Estes compostos são produzidos essencialmente por descarboxilação de aminoácidos essenciais, que deixam assim, de estar disponíveis para o animal hospedeiro. Para além disso, a produção de ácidos gordos voláteis por parte dos microrganismos, afecta o pH intestinal necessário para a acção das enzimas digestivas. Assim, o decréscimo da actividade fermentativa da microflora do intestino, que pode resultar do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, leva a um aumento da disponibilidade de nutrientes essenciais ao animal (Roth *et al.*, 1998, citados por Windisch *et al.*, 2008).

No estudo de Utiyama (2004) verificou-se um aumento do peso relativo do pâncreas, quando foram utilizados extractos vegetais (alho, cravo-da-índia, canela, tomilho, pimenta, eugenol, cinamaldeído) na dieta de leitões, o que pode ter resultado de um aumento do estímulo das secreções pancreáticas e do aumento da actividade enzimática.

O estudo de Manzanilla *et al.* (2004), com leitões, mostrou que o uso de alguns extractos como carvacrol, cinamaldeído e capsaicina levam a um aumento do tempo de retenção gástrico, demonstrando um efeito directo da capsaicina na motilidade gástrica (Gonzales *et al.*, 1998, citados por Manzanilla *et al.*, 2004), o que resulta numa melhor digestão dos alimentos.

Existem muito poucos trabalhos onde o efeito do uso de extractos vegetais na digestibilidade da matéria seca e dos diferentes nutrientes foi avaliado, sendo necessária maior pesquisa. Analisando a tabela 2, pode verificar-se que no trabalho de Utiyama (2004) apenas se observaram melhorias significativas na digestibilidade da matéria seca (8%), havendo também uma melhoria na digestibilidade da proteína bruta (4,5%), embora não significativa. Oetting *et al.* (2006) obtiveram uma melhoria de 4 e 5% na digestibilidade aparente da matéria seca, quando incluíram 1,4 e 2,1 g de extracto vegetal por kg de alimento, respectivamente.

Tabela 2 – Efeito do uso de extractos vegetais na digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e da proteína bruta (PB) em suínos

Animais	Extracto Vegetal*	Nível de Inclusão (g/kg)	Digestibilidade aparente (diferença em relação à ração base)		Referência
			MS	PB	
Leitões (pós-desmame)	Alho, cravo-da-índia, canela, tomilho, pimenta, eugenol, cinamaldeído	0,5	108	100	Utiyama (2004)
	Cravo-da-índia, tomilho, orégão, eugenol, carvacrol	0,7	100	-	Oetting <i>et al.</i> (2006)
		1,4	104		
suínos em fase de crescimento e engorda	Tomilho, alecrim, orégão	2,1	105	-	Yan <i>et al.</i> (2010)

Legenda: < 100 – o parâmetro piorou significativamente

100 – o parâmetro não foi afectado ou não se verificaram diferenças significativas

> 100 – o parâmetro foi melhorado significativamente

2.2.2.4 - Efeito na histologia intestinal

A altura das vilosidades e a profundidade das criptas, no intestino delgado, são importantes indicadores da saúde digestiva dos suínos e estão directamente relacionados com a capacidade de absorção da mucosa intestinal (Buddle & Bolton, 1992, citados por Manzanilla *et al.*, 2004). Teoricamente, a altura das vilosidades depende do balanço entre a actividade mitótica dos enterócitos das criptas e a descamação epitelial provocada por agressores (Cerca *et al.*, 1988, e Nabuurs, 1995, citados por Manzanilla *et al.*, 2004).

Como foi dito anteriormente, os óleos essenciais demonstram um efeito inibidor contra a colonização e proliferação de microrganismos patogénicos. Deste modo, verifica-se uma maior protecção da mucosa intestinal contra a acção destes microrganismos, favorecendo a estrutura das vilosidades intestinais.

Oetting *et al.* (2006) observaram um decréscimo da relação altura das vilosidades:profundidade das criptas do íleo, quando adicionaram uma mistura de extractos vegetais à ração de leitões, o que resulta numa diminuição da capacidade de absorção de nutrientes. No entanto, os mesmos autores verificaram que os maiores níveis de inclusão (1,4 e 2,1 g/kg) destes aditivos resultaram numa maior altura das vilosidades e menor profundidade das criptas do jejuno, embora estas diferenças, em relação à dieta base, não sejam significativas.

No estudo de Utiyama (2004), embora os resultados também não tenham mostrado diferenças significativas, verificou-se que a adição de extractos de plantas à ração beneficiou a integridade do epitélio intestinal, aumentando a altura das vilosidades e a relação altura das vilosidades:profundidade das criptas no duodeno e no jejuno dos leitões.

Assim, conclui-se que os diversos estudos realizados com leitões mostram resultados pouco consistentes. Alguns concluem que o uso de extractos de plantas levou a um aumento da altura das vilosidades e a uma redução da profundidade das criptas no duodeno, jejuno, íleo e cólon, enquanto outros concluem que não houve alteração de nenhum destes parâmetros ou que houve mesmo uma redução da altura das vilosidades e um aumento da profundidade das criptas (Manzanilla *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2006; Nofrarías *et al.*, 2006; Oetting *et al.*, 2006; Utiyama, 2004).

2.3 – Utilização dos Ácidos Orgânicos Fumárico e Málico na Alimentação dos Suínos

Os **ácidos orgânicos** estão distribuídos na natureza como constituintes naturais das plantas ou dos tecidos animais, sendo também produzidos através da fermentação microbiana dos hidratos de carbono no intestino grosso dos suínos (Partanen & Mroz, 1999).

Desde há algumas décadas que os ácidos orgânicos têm vindo a ser usados na indústria alimentar como conservantes, protegendo os alimentos da actividade destrutiva de bactérias e fungos ou aumentando a conservação de alimentos fermentados, como as silagens (Canibe *et al.*, 2001). A sua utilização em alimentação animal tem também sido muito explorada, com o intuito de acidificar as dietas para animais. Vários estudos têm demonstrado que o uso destes aditivos alimentares melhora as performances zootécnicas dos animais, nomeadamente dos suínos, através, principalmente, do seu efeito positivo sobre a digestibilidade das proteínas, dos aminoácidos e da energia (por exemplo, Blank *et al.*, 1999; Falkowski & Aherne, 1984; Gabert & Sauer, 1995; Radecki *et al.*, 1988) e do seu efeito antimicrobiano sobre microrganismos patogénicos existentes no tracto gastrointestinal (por exemplo, Hansen *et al.*, 2007; Knarreborg *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2007). Para além disso, depois de absorvidos, os ácidos orgânicos podem ser usados como substratos imediatos no metabolismo intermédio, principalmente como fontes de energia (Partanen & Mroz, 1999).

O **ácido fumárico** é um composto inodoro, não volátil e sólido o que facilita o seu manuseamento e processamento na indústria dos alimentos (Blank *et al.*, 2001). Nos suínos, o fumarato (sal ou éster do ácido fumárico) surge como um metabolito da degradação da fenilalanina e da tirosina, ocorrendo também como um intermediário no ciclo da ureia e durante a síntese de purinas. É também um importante metabolito intermediário no ciclo de Krebs, usado pelas células para produzir energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) (Stryer, 1988, citados por Partanen & Mroz, 1999).

O **ácido málico** é uma substância adstringente, que ocorre naturalmente sob a forma líquida e que pode ser encontrada em várias frutas como a maçã, a pêra e a uva. Comercialmente é produzido como aditivo de sumos de fruta e como conservante de alimentos (Gottlob *et al.*, 2006). O malato (sal ou éster do ácido málico) é também um importante intermediário do ciclo de Krebs. Na tabela 3 estão sintetizadas mais algumas propriedades físico-químicas dos ácidos fumárico e málico.

Tabela 3 – Algumas propriedades físico-químicas dos ácidos fumárico e málico (Partanen & Mroz, 1999).

Ácido	Fórmula	Forma Física	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/ml)	Constante de Acidez (pK _{a1} /pK _{a2})*	Solubilidade em Água	Odor
Fumárico	COOHCH:CHCOOH	sólido	116,07	1,635	3,02/4,38	0,63g/100ml	inodoro
Málico	COOHCH ₂ CH(OH)COOH	líquido	134,09	1,609	3,46/5,10	55,8g/100ml	Maçã

*Os ácidos fumárico e málico são dipróticos (doam 2 prótons). Assim a sua ionização ocorre em duas etapas, havendo uma constante de acidez para cada etapa.

2.3.1 – Efeito da sua utilização no crescimento dos suínos

Vários estudos têm sido feitos com o intuito de avaliar o efeito do uso dos ácidos orgânicos fumárico (Edmonds et al., 1985; Falkowski & Aherne, 1984; Giesting & Easter, 1985; Giesting et al., 1991; Krause et al., 1994; Owusu-Asiedu et al., 2003; Radecki et al., 1988) e málico (Gottlob et al., 2006; Krause et al., 1994) nas performances zootécnicas dos suínos.

Através da análise da literatura (tabela 4) verifica-se que a inclusão de diferentes quantidades de **ácido fumárico** na dieta de leitões (pós-desmame) não afecta a ingestão de alimento mas, melhora o ganho de peso e o índice de conversão alimentar (ou a razão ganho de peso/consumo de alimento), em comparação com a dieta base. Em média, o ganho de peso melhorou 4% (variando entre -1 e 14%), o índice de conversão melhorou igualmente 4% (variando entre 0 e 7%) e a razão ganho de peso/consumo de alimento melhorou 6% (variando entre 0 e 15%).

No estudo de Giesting & Easter (1985) verificou-se um decréscimo do ganho de peso, com o nível de inclusão de 2% de ácido fumárico, que pode talvez ser explicado pelo decréscimo de ingestão de alimento que também se verificou (embora não significativo).

No caso particular do estudo de Radecki et al. (1988), embora não se tenham verificado alterações na média das 4 semanas de ensaio, observaram-se grandes alterações na primeira semana. O ganho de peso e a razão ganho de peso/consumo de alimento melhoraram extraordinariamente neste período. Estes resultados suportam a teoria segundo a qual o efeito dos ácidos orgânicos é mais forte imediatamente após o desmame mas diminui com o crescimento do leitão (Giesting et al., 1991).

Nos estudos em que foi avaliado o efeito do **ácido málico** (tabela 4) não se verificaram alterações significativas na ingestão de alimento, no ganho de peso nem no índice de conversão.

A ingestão voluntária de alimento está claramente relacionada com a **palatabilidade** da dieta. No entanto, poucos estudos têm sido feitos para avaliar o efeito do uso de ácidos orgânicos na palatabilidade dos regimes para leitões. No estudo de Henry *et al.* (1985) citados por Partanen & Mroz (1999), em que uma dieta sem adição de ácidos orgânicos e outra acidificada (ácidos cítrico e fumárico) foram disponibilizadas, verificou-se que os leitões consumiam muito mais quantidade da primeira dieta. Dependendo do seu odor e sabor, os ácidos orgânicos podem provocar a rejeição do alimento por parte dos animais.

A inclusão de quantidades excessivas de ácidos orgânicos na dieta pode levar a uma alteração do equilíbrio ácido-base do leitão (excessiva libertação de iões H^+ que tem de ser compensada pelo organismo), levando a uma **acidose metabólica**, que resulta numa diminuição da ingestão de alimento e do crescimento. No entanto, os ácidos orgânicos que são metabolizados via Ciclo de Krebs, como o fumárico e o cítrico, aparentemente não causam acidose, independentemente do seu nível de inclusão (Giesting *et al.*, 1991, Eckel *et al.*, 1992, Eidelsbuerger *et al.*, 1992, Grassmann *et al.*, 1992, citados por Partanen & Mroz, 1999). A inclusão de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) na dieta pode ser uma solução para evitar a ocorrência de acidose, uma vez que este composto tem um elevado poder tampão e, em conjunto com a amónia, é importante na regulação do equilíbrio ácido-base do organismo (Duke, 1982, citado por Krause *et al.*, 1994).

Nos vários estudos realizados, verifica-se uma grande **variabilidade de resultados** obtidos com o uso destes aditivos alimentares, que pode ser consequência de vários factores como composição e poder tampão da dieta, tipo e nível de inclusão dos ácidos orgânicos utilizados, idade dos animais, padrões de higiene e de bem-estar animal e condições ambientais (Blank *et al.*, 1999; Mroz, 2005; Pastuszewska *et al.*, 2007).

Tabela 4 – Efeito do uso dos ácidos orgânicos fumárico e málico nas performances produtivas de leitões (pós-desmame)

Ácido	Duração do Ensaio	Nível de Inclusão (g/kg)	Efeito do uso de ácidos orgânicos (diferença em relação à ração base)				Referência
			Ingestão de Alimento	Ganho de Peso	IC ¹	(G:F) ²	
fumárico	3 semanas	15	-	106	-	104	Edmonds <i>et al.</i> (1985)
fumárico	4 semanas	10 20	100 100	100 100	106 107	- -	Falkowski & Aherne (1984)
fumárico	4 semanas	10 20 30 40	100 100 100 100	100 99 113 114	- - - -	104 110 115 115	Giesting & Easter (1985)
fumárico	4 semanas	20 ^a 30 ^a 30 ^b	100 100 100	100 100 104 ^e /113 ^f	- - -	107 ^c /105 ^d 107 ^c /107 ^d 102 ^e /106 ^f	Giesting <i>et al.</i> (1991)
fumárico	2 semanas	20	100	100	-	100	Owusu-Asiedu <i>et al.</i> (2003)
fumárico	-	5 - 25	100	105	103	-	Partanen (2001) cit. in Mroz (2005)
fumárico	semana 1 semana 1 – 2 semana 1 – 4	15 30 15 30 15 30	100 100 100 100 100 100	303 233 100 100 100 100	- - - - - -	277 238 121 100 100 100	Radecki <i>et al.</i> (1988)
fumárico	4 semanas	25	100	100	100	-	Krause <i>et al.</i> (1994)
málico		25	100	100	100	-	
málico	4 semanas	15	100	100	100	-	Gottlob <i>et al.</i> (2006)

Legenda: < 100 – o parâmetro piorou significativamente

100 – o parâmetro não foi afectado ou não se verificaram diferenças significativas

> 100 – o parâmetro foi melhorado significativamente

¹ IC= Índice de Conversão; ² G:F = Gain:Feed (Ganho de peso/Consumo de Alimento)

^a Ensaio 1: efeito do ácido fumárico na performance de leitões que receberam diferentes tipos de dietas

^b Ensaio 2: efeito do ácido fumárico na performance de leitões que receberam diferentes fontes de proteína

^c Dieta 1: bagaço de soja

^d Dieta 2: bagaço de soja + soro de leite em pó

^e Fonte de proteína 1: concentrado de proteína de soja

^f Fonte de proteína 2: caseína

2.3.2 - Modos de acção

2.3.2.1 – Efeito na digestibilidade

Vários estudos têm demonstrado que a adição de ácidos orgânicos diminui o **pH da dieta** (por exemplo, Blank *et al.* 1999, Falkowski & Aherne, 1984, Gabert & Sauer, 1995, Giesting & Easter, 1985). No estudo de Gabert & Sauer (1995), a adição de 15 e 30 g/kg de ácido fumárico diminuiu o pH da dieta base de 6,3 para 4,4 e 3,9 respectivamente. O decréscimo do pH da dieta resultante da adição de ácidos orgânicos está dependente da constante de acidez (pK_a) do ácido e do poder tampão da dieta. A capacidade de acidificação difere entre ácidos e decresce na seguinte ordem: ácido tartárico > ácido cítrico > ácido málico > ácido fumárico > ácido láctico e ácido fórmico > ácido acético > ácido propiónico. Os diferentes ingredientes que podem compor as dietas de animais variam quanto ao seu poder tampão. O poder tampão é baixo nos cereais e seus subprodutos, médio ou alto nas fontes de proteína e muito alto nas fontes de minerais (excepto nos fosfatos bicálcico e monossódico) (Patanen & Mroz, 1999).

O **pH gástrico** sofre também um decréscimo com o uso de ácidos orgânicos, compensando a baixa produção de ácido clorídrico (HCl) que ocorre nos animais jovens, principalmente quando sujeitos a um desmame precoce. Este decréscimo de pH resulta num aumento da actividade das enzimas proteolíticas e do tempo de retenção gástrico. Uma menor taxa de esvaziamento gástrico permite uma degradação enzimática durante mais tempo. Assim, as proteínas são hidrolisadas mais eficientemente no estômago (Easter, 1988, Kirchgessner & Roth, 1988, Ravidran & Kornegay, 1993, Gabert & Sauer, 1994, citados por Partanen & Mroz, 1999).

Nos estudos de Kirchgessner & Roth (1978; 1980) citados por Partanen & Mroz (1999), verificou-se o efeito positivo do ácido fumárico na **digestibilidade total aparente** da matéria seca, energia bruta e proteína bruta, e na retenção de N. Na tabela 5 estão sintetizados os efeitos do uso do ácido fumárico no regime de leitões, na digestibilidade ileal aparente, referenciados por alguns autores. Quanto à **digestibilidade ileal aparente** da matéria seca, não se verificam diferenças significativas em relação à dieta base. No que diz respeito à avaliação do mesmo parâmetro em relação à proteína bruta, Blank *et al.* (1999) verificaram uma melhoria com os níveis de inclusão de 1, 2 e 3%, sendo o segundo o que obteve melhores resultados (um aumento de 10%). Em relação à digestibilidade ileal aparente de vários aminoácidos essenciais (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina), o mesmo estudo, mostrou na generalidade uma melhoria. No estudo de Gabert & Sauer (1995), observou-se uma redução da digestibilidade

ileal aparente da proteína bruta e da arginina, que foi justificada pelos autores, como o resultado do aumento da actividade microbiana no intestino delgado.

Relativamente ao ácido málico, não se encontraram estudos onde foi avaliado o seu efeito sobre a digestibilidade dos diferentes nutrientes.

Tabela 5 – Efeito do ácido fumárico na digestibilidade ileal aparente da matéria seca (MS), da proteína bruta (PB) e de alguns aminoácidos (AA) em leitões

Duração do Ensaio	Nível de Inclusão (g/kg)	Digestibilidade Ileal Aparente (diferença em relação à ração base)											Referência
		MS	PB	AA									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	
13 dias	10	100	104	100	105	104	100	101	100	100	108	104	Blank <i>et al.</i> (1999)
	20	100	110	107	110	109	109	107	103	108	112	109	
	30	100	106	103	108	107	107	104	99	107	110	108	
22 dias	15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	Gabert & Sauer (1995)
	30	100	95	95	100	100	100	100	100	100	100	100	
14 dias	20	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Giesting & Easter (1991)

Legenda: < 100 – o parâmetro piorou significativamente

100 – o parâmetro não foi afectado ou não se verificaram diferenças significativas

> 100 – o parâmetro foi melhorado significativamente

1 - arginina, 2 - histidina, 3 - isoleucina, 4 - leucina, 5 - lisina, 6 - metionina, 7 - fenilalanina, 8 - treonina, 9 - valina

2.3.2.2 – Efeito sobre a microflora intestinal, padrão de AGV e histologia intestinal

Um importante objectivo do uso de ácidos orgânicos na dieta dos suínos é a inibição da microflora intestinal que compete com o animal pelos nutrientes e, conseqüentemente a redução dos seus metabolitos tóxicos (amónia e aminas). O combate aos microrganismos patogénicos (por exemplo, *E. coli* e *Salmonella*) existentes quer no tracto digestivo quer na ração, é também benéfico para a saúde do animal.

Os ácidos orgânicos exercem o seu **efeito antimicrobiano** quando, na sua forma indissociável, se difundem através da membrana citoplasmática das células bacterianas. Dentro das células, onde o pH é cerca de 7, o ácido dissocia-se, libertando iões H⁺, causando a acidificação do citoplasma e inibindo o metabolismo celular, levando à morte da célula (Lueck, 1980, citado por Knarreborg *et al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que a acidificação da dieta através do uso de ácido fumárico tem sido eficaz no combate a microrganismos patogénicos como a *E. coli* e a

Salmonella e, conseqüentemente na diminuição da mortalidade de leitões (Cole *et al.*, 1968 e Thomlinson & Lawrence, 1981, citados por Walsh *et al.*, 2007a). Por outro lado, as bactérias ácido-lácticas que são benéficas para o animal sofrem também um efeito inibidor por parte do ácido fumárico, como mostram os resultados do estudo de Knarreborg *et al.* (2002). No estudo de Gedek *et al.* (1992) citado por Canibe *et al.* (2001) foi demonstrado que a inclusão de 1,8% de ácido fumárico na dieta de leitões inibiu o crescimento e proliferação de *Lactobacillus* no duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon, de *Enterococcus* no duodeno e jejuno, e de *E.coli* no jejuno. Scipioni *et al.* (1978) citados por Falkowski & Aherne (1984) observaram um decréscimo do número de bactérias coliformes e de microrganismos anaeróbios nos intestinos delgado e grosso de leitões, com o uso de ácido fumárico e cítrico. Os resultados do estudo de Blank *et al.* (2001) indicam que a utilização de ácido fumárico reduziu a actividade microbiana no intestino delgado, uma vez que se verificaram baixas concentrações de produtos da sua fermentação (aminas, amónia, ácido láctico) e lipopolissacarídeos (usados como indicador do número de bactérias gram-negativas).

Os ácidos orgânicos fornecidos na dieta podem ter um efeito modulador no padrão de AGV produzidos no intestino. No estudo de Kasproicz-Potocka *et al.* (2009), em que foi testado o efeito do formato de sódio, do ácido benzóico e do ácido fumárico em separado, apenas o último não afectou o padrão de AGV no intestino delgado, em comparação com a dieta base. Também o estudo de Gabert & Sauer (1995) mostrou que a inclusão de ácido fumárico na dieta de leitões não afectou a concentração de AGV no intestino delgado.

Partanen & Mroz (1999) afirmam que os ácidos orgânicos podem ter um efeito indirecto sobre a **histologia intestinal**, já que podem influenciar o padrão de fermentação microbiana e os produtos dessa fermentação estimulam a proliferação das células epiteliais do intestino. Uma vez que o ácido fumárico é também uma fonte de energia, existe a possibilidade de que tenha um efeito trófico na mucosa do intestino delgado, resultando num aumento da superfície e capacidade de absorção, devido a uma recuperação mais rápida das células epiteliais depois do desmame (Blank *et al.*, 1999). No estudo de Owusu-Asiedu *et al.* (2003) a inclusão de ácido fumárico resultou numa maior altura das vilosidades do jejuno e numa maior razão altura das vilosidades:profundidade das criptas. Visto que o ácido fumárico previne a colonização e proliferação de bactérias patogénicas, verifica-se uma maior protecção da parede intestinal, mantendo a sua integridade.

Relativamente ao ácido málico, não foi encontrada nenhuma bibliografia que suporte o seu efeito antimicrobiano, assim como o seu efeito sobre o padrão de AGV e sobre a histologia intestinal.

2.4 – Microencapsulação de Óleos Essenciais e Ácidos Orgânicos

A eficácia de aditivos alimentares como os óleos essenciais e os ácidos orgânicos, usados em produção animal, ainda não pode ser equiparada à dos antibióticos promotores de crescimento. Diversos estudos têm sido feitos para avaliar o efeito da utilização desses aditivos no crescimento dos suínos, tendo, no entanto, sido obtidos resultados muito variados. As principais limitações do uso de óleos essenciais e ácidos orgânicos residem no facto destes serem imediatamente absorvidos e metabolizados quando entram no duodeno. Desta forma, a sua acção ao longo das restantes partes do tracto digestivo (jejuno, íleo, ceco e cólon) fica comprometida, uma vez que as quantidades que aí chegam são mínimas ou nulas (Piva *et al.*, 2007b). Assim, para aumentar a eficácia destes aditivos, deve fazer-se um controlo minucioso do seu comportamento dentro do tubo digestivo, para assegurar a sua disponibilidade em quantidades suficientes no local de acção apropriado e limitar a sua absorção (Meunier *et al.*, 2006). As técnicas de fabrico dos aditivos, nomeadamente a microencapsulação, podem ser uma possível solução.

A **microencapsulação** é uma técnica que permite que os componentes activos (neste caso, óleos essenciais e ácidos orgânicos) sejam revestidos por uma camada protectora, constituindo uma microcápsula. Esta técnica permite uma libertação lenta e continuada ao longo de todo o tubo digestivo, aumentando assim a disponibilidade luminal destes compostos no íleo e cólon (Meunier *et al.*, 2006).

As técnicas de fabrico das microcápsulas são muito complexas e são regidas por 4 factores principais: o componente activo, as propriedades do núcleo, o processo e equipamento de revestimento e o material e a formulação do revestimento. É essencial que a técnica de microencapsulação crie um núcleo adequado e uma aplicação uniforme do polímero de revestimento. Existem vários polímeros de revestimento que permitem aumentar o período durante o qual, os componentes activos estão protegidos contra a absorção e a degradação no tubo digestivo (Meunier *et al.*, 2006). Assim, o revestimento pode ser composto, por exemplo, por uma dispersão aquosa de etilcelulose (Meunier *et al.*, 2006), por uma matriz de lípidos vegetais hidrogenados (Piva *et al.*, 2007b) ou por uma matriz de proteínas (Spanghero *et al.*, 2009), que vão sendo degradados ao longo da sua passagem pelo tubo digestivo.

A microencapsulação permite também melhorar a mistura e a estabilidade dos óleos essenciais e ácidos orgânicos na ração, fazendo com que a sua administração aos animais seja mais fácil (Meunier *et al.*, 2007; Spanghero *et al.*, 2009). Para além da microencapsulação destes aditivos, esta técnica pode ter outras aplicações, como a absorção lenta de medicamentos, a protecção de aminoácidos e proteínas contra a

degradação no rúmen ou a protecção no manuseamento de produtos irritantes ou corrosivos (Piva *et al.*, 1997, e Noel, 2000, citados por Piva *et al.*, 2007b).

2.4.1 – Utilização em suínos

No estudo de Piva *et al.* (2007b) foram comparados os comportamentos de duas misturas de ácidos orgânicos (fumárico, málico, cítrico e sórbico) e extractos de plantas (vanilina e timol), uma microencapsulada e outra sob a forma livre, no tubo digestivo de suínos, estando os resultados obtidos sintetizados na tabela 6. O ácido sórbico e a vanilina foram usados como marcadores para avaliar a quantidade de ácidos orgânicos e óleos essenciais, respectivamente, que chegaram às diferentes partes do tubo digestivo. Verificou-se que, enquanto nos porcos que receberam a mistura sob a forma livre, as concentrações de ácido sórbico e vanilina desapareceram quase de imediato depois do estômago (rapidamente absorvidas no jejuno), nos porcos que receberam a mistura microencapsulada, essas concentrações diminuíram gradualmente ao longo do tubo digestivo. O revestimento das microcápsulas evitou a libertação e metabolismo dos compostos, permitindo que, no caso do ácido sórbico, 15% da quantidade detectada no estômago, chegasse ao cólon. Embora esta técnica atrase a absorção dos compostos, ela não afecta a sua biodisponibilidade (Piva *et al.*, 1997, citados por Piva *et al.*, 2007b). A permanência dos componentes activos durante mais tempo no tubo digestivo permitiu que estes actuassem sinergicamente sobre a microflora intestinal, diminuindo a contagem de bactérias coliformes (Piva *et al.*, 2007b).

No estudo de Piva *et al.* (2007a), utilizando leitões com 21 dias de idade, verificou-se que os animais que receberam 1 kg/ton de uma mistura de ácidos orgânicos (fórmico e láctico) e extractos vegetais microencapsulados eram 6% e 3,3% mais pesados do que os leitões que receberam 11 kg/ton de uma mistura dos mesmos ácidos sob a forma livre, ao fim de 21 e 49 dias de ensaio respectivamente. Assim, para além de melhorar o crescimento, a microencapsulação permitiu diminuir a dose de ácidos a ser incluída na ração.

Em estudos *in vitro* (Meunier *et al.*, 2006; Meunier *et al.*, 2007), também foi possível demonstrar que a microencapsulação (2 técnicas: “rotary fluidized-bed” e “spray-cooling”) permite uma libertação lenta e gradual de extractos vegetais. Estes estudos mostraram ainda que quanto maior for o tamanho das partículas (microcápsulas), mais lenta é a libertação dos componentes activos. No estudo *in vitro* de Parris *et al.* (2005), onde foram simuladas as condições físico-químicas do estômago, intestino delgado e grosso, concluiu-se que, utilizando uma técnica diferente de encapsulação (“zein nanospheres”), seria

provável que os óleos essenciais tivessem uma digestibilidade limitada no estômago, uma lenta libertação no intestino delgado e uma rápida libertação no intestino grosso. Apesar dos resultados positivos obtidos *in vitro*, mais estudos com animais são necessários para comprovar a eficácia *in vivo* da microencapsulação.

Tabela 6 – Comparação entre duas misturas de ácidos orgânicos e extractos de plantas, uma microencapsulada e outra sob a forma livre, administradas a suínos (Piva *et al.*, 2007b).

	Mistura microencapsulada	mistura sob a forma livre
% de ácido sórbico¹		
estômago	100	100
parte cranial do jejuno	44	2
parte caudal do jejuno	35	2
íleo	22	0
ceco	29	0
cólon	15	0
% de vanilina¹		
estômago	100	100
parte cranial do jejuno	48	0
parte caudal do jejuno	55	0
íleo	0	0
ceco	0	0
cólon	0	0
BAL² (log cfu/g³)		
parte caudal do jejuno	9*	9*
ceco	10.8	9.41
coliformes (log cfu/g³)		
parte caudal do jejuno	6.35	7.99
ceco	6.78	7.58

¹ O ácido sórbico e vanilina foram usados como marcadores para avaliar a quantidade de ácidos orgânicos e óleos essenciais, respectivamente, que chegaram às diferentes partes do tubo digestivo

² bactérias ácido-lácticas

³ g de conteúdo intestinal

* valor aproximado às unidades

3 - Materiais e Métodos

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito da utilização de duas misturas de óleos essenciais e de ácidos orgânicos no regime alimentar de leitões no período pós-desmame. A fase experimental deste ensaio decorreu no sector experimental da Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (ISA). A fase analítica decorreu no Laboratório Pais de Azevedo do ISA e na Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

3.1- Animais

Neste ensaio foram utilizados 24 leitões do sexo masculino, resultantes do cruzamento Duroc x Landrace. Os animais iniciaram o ensaio com cerca de 3 semanas de idade e com um peso vivo médio de 6,38 kg (\pm 0,58 kg). Os leitões foram divididos em 3 grupos (8 leitões cada), de forma homogénea em função do peso vivo, e cada grupo recebeu um dos 3 regimes experimentais. Depois de identificados, os leitões foram colocados em gaiolas metabólicas individuais (110 cm x 80 cm), equipadas com comedouro, bebedouro (chupeta), piso ripado e dois tabuleiros em aço inoxidável, que permitiam a recolha separada de fezes e urina (Figura 1). A sala de ensaio dispunha de um equipamento de ar condicionado que permitia o controlo da temperatura ambiente (mantida a 26°C) e de um sistema de ventilação forçada para renovação do ar.



Figura 1 – Sala de ensaio

3.2 - Regimes Alimentares

Os regimes alimentares foram preparados na fábrica de rações da Secção de Produção Animal do ISA. A formulação base dos 3 regimes teve em conta as necessidades alimentares dos leitões respeitando as recomendações do NRC (1998) para leitões entre 5 e 20 kg de peso vivo. Foram fabricados 3 regimes distintos: um regime base (RB) que serviu de controlo, um regime em que se adicionou 0,1% da mistura de óleos essenciais e ácidos orgânicos SW01 (regime SW01) e um regime em que se adicionou 0,1% da mistura SW02, (regime SW02). A mistura SW01 era composta por 42,5% de ácido fumárico, 8,5% de ácido málico e 3% de óleos essenciais (carvacrol, eugenol, cinamaldeído). A mistura SW02 era composta por 37,5% de ácido fumárico, 7,5% de ácido málico e 5% de óleos essenciais (carvacrol, eugenol e cinamaldeído). Os constituintes (g/kg) e a composição química (%) dos 3 regimes experimentais encontram-se descritos nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 – Composição (g/kg) dos regimes experimentais

Composição (g/kg)	Regimes		
	RB	SW01	SW02
Trigo	661	660	660
Bagaço de soja (48)	160	160	160
Soro de leite	50	50	50
Farinha de peixe (70)	70	70	70
Óleo de soja	30	30	30
SW01	0	1	0
SW02	0	0	1
L-Lisina	4	4	4
DL-Metionina	2	2	2
Carbonato de cálcio	7	7	7
Fosfato bicálcico	9	9	9
Cloreto de sódio	2	2	2
CMV ¹	5	5	5

¹ Complexo mineral e vitamínico. Composição por kg de alimento: Vit. A: 25000 UI; Vit. D3: 2000 UI; Vit. E: 20 UI; Vit. C: 200 mg; Vit. B1: 1,5 mg; Vit. B2: 5 mg; Vit. B3: 30 mg; Vit. B5: 15 mg; Vit. B6: 2,5 mg; Vit. B9: 0,5 mg; Vit. B12: 0,03 mg; Vit. K3: 1 mg; Vit. H2: 80 mg; colina : 300 mg; I (iodeto de potássio): 1 mg; Mn (óxido de manganês): 50 mg; Fe (carbonato ferroso): 120 mg; Zn (óxido de zinco): 140 mg; Cu (sulfato cúprico): 160 mg; Se (selenito de sódio): 0,3 mg; Co (carbonato de cobalto): 0,5 mg.

Tabela 8 – Composição química (%) dos regimes experimentais

Composição química (%)	Regimes		
	RB	SW01	SW02
Matéria seca	88,71	88,38	88,65
Cinza	5,53	5,33	5,24
Proteína bruta (N x 6,25)	20,13	20,34	20,29
NDF	11,42	11,25	10,52
ADF	3,40	3,10	2,55
Lisina ¹	1,32	1,32	1,32
Metionina ¹	0,70	0,70	0,70
Treonina ¹	0,82	0,82	0,82
Triptofano ¹	0,24	0,24	0,24

¹ Valores calculados de acordo com (NRC, 1998)

A preparação dos regimes começou com o processo de moenda do trigo num moinho de martelos móveis com crivo de 3 mm de diâmetro. Em seguida procedeu-se à pesagem das várias matérias-primas e à sua introdução numa misturadora horizontal com fita em espiral, onde todos os ingredientes foram misturados durante cerca de 10 minutos. Finalmente, os regimes passaram por um processo de granulação numa prensa com um crivo de 3 mm. Após um período de arrefecimento o alimento já granulado foi armazenado, sendo recolhidas duas amostras de cada regime para posterior análise laboratorial.

3.3 - Protocolo Experimental

Após um período de 3 dias de adaptação, aos regimes experimentais e às instalações, seguiu-se um período experimental de 5 semanas (Figura 2). Durante todo o período experimental, a ingestão de alimento foi controlada diariamente através da pesagem de alimento distribuído e da pesagem de alimento refugado recolhido, para cada leitão, sendo este último conservado no frio (-20 °C) para posterior análise do seu teor em matéria seca. O alimento era distribuído diariamente em duas refeições, uma de manhã e outra de tarde. As quantidades distribuídas eram ajustadas diariamente em função das quantidades refugadas e do peso vivo dos animais e de modo a assegurar pelo menos 10% de refugo.

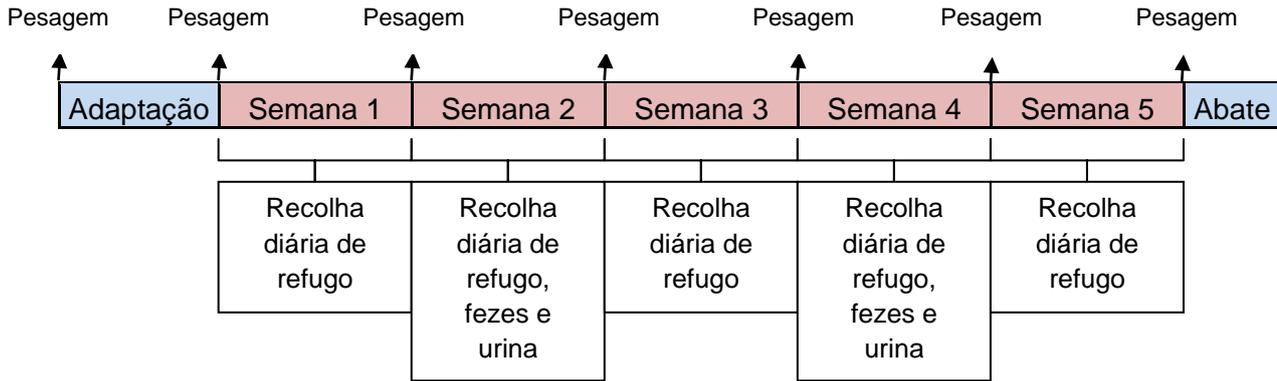


Figura 2 – Esquema do ensaio experimental

No início de cada semana os animais foram pesados. Na segunda (período de recolha 1) e quarta (período de recolha 2) semanas, foram feitas recolhas de fezes e urina que eram pesadas, identificadas individualmente e armazenadas numa arca frigorífica (-20 °C). A consistência das fezes foi avaliada diariamente utilizando uma escala de 0 a 3, de acordo com Marquardt *et al.* (1999) (Tabela 9). As urinas foram recolhidas em 10ml de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 5%, com o objectivo de evitar perdas de azoto por volatilização.

Tabela 9 – Índice de consistência fecal e respectivo estado das fezes

Índice de consistência	Estado das fezes
0	Normais
1	Moles
2	Diarreia moderada
3	Diarreia severa

No final do período experimental os leitões foram abatidos após um jejum de 12 h. Imediatamente antes do abate os animais foram pesados. Ao abate foram recolhidos os conteúdos intestinais para medição do pH e mais tarde se proceder à determinação da MS, dos AGV e da actividade enzimática microbiana. Foram também recolhidas amostras de três segmentos do intestino delgado: duodeno (a cerca de 10 cm do piloro), jejuno (a cerca de 5,5 m do piloro) e íleo (a cerca de 60 cm da válvula íleo-cecal), que foram imediatamente fixadas em formol tamponado, para posterior observação e medição das características morfológicas das criptas e das vilosidades intestinais. O desenvolvimento do tracto gastrointestinal foi também avaliado, através do peso do estômago cheio e vazio, do peso do intestino delgado cheio e vazio e seu comprimento, do peso do intestino grosso cheio e

vazio e seu comprimento, do peso do pâncreas, do peso do fígado, do peso da vesícula biliar e do peso do baço. Foi ainda medido o pH do conteúdo do estômago, do íleo, do ceco e do cólon.

3.3.1 - Preparação das Amostras dos Regimes Alimentares, dos Refugos, das Fezes e das Urinas

As amostras dos regimes alimentares foram moídas num moinho de Retch com um crivo de 1 mm de diâmetro para serem posteriormente analisadas.

Os refugos foram descongelados, colocados em tabuleiros de alumínio (previamente desumidificados a 103 °C em estufa durante 4 h) e pesados (peso do refugo húmido). Foram secos na estufa a 103 °C, sendo depois arrefecidos num exsiccador e pesados (peso do refugo seco), para posterior determinação da ingestão semanal de alimento.

As fezes foram descongeladas, colocadas em tabuleiros de alumínio e pesadas (peso das fezes húmidas). Foram levadas à estufa a 70 °C para secagem, sendo posteriormente arrefecidas em exsiccador e pesadas (peso das fezes secas). As fezes secas foram moídas num moinho Retch com um crivo de 1 mm de diâmetro e armazenadas em frascos individuais (por leitão e por período de recolha) para posterior determinação da digestibilidade fecal aparente.

As urinas foram descongeladas e homogeneizadas, sendo recolhida uma amostra por leitão e por período de recolha que foi novamente congelada (-20 °C) em frasco, para posterior determinação do balanço azotado.

3.4 – Análises

3.4.1 – Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis (AGV)

Os AGV foram doseados pelo método de Jouany (1982), nos conteúdos do íleo, ceco e cólon. Estes conteúdos foram recolhidos após o abate, para frascos onde previamente foram colocados 2 ml de ácido ortofosfórico (0,03 M) e conservados a -20 °C. Aquando da sua utilização, as amostras foram primeiro descongeladas em meio fresco e em seguida centrifugadas (centrifuga Beckman J2-HS) a 5000 rpm durante 20 min. A partir do sobrenadante foram recolhidas 2 amostras (1 ml cada) para 2 *ependorfs*, que foram imediatamente congelados a -20 °C. Para serem analisadas, as amostras foram descongeladas, adicionou-se 1 ml de ácido metil valérico a 1% (p/v) e homogeneizou-se antes da injeção da amostra (0,3 µl) no cromatografo (Perkin-Elmer 8410 Gas

Chromatograph). O injector e o detector estavam a 120 °C de temperatura, enquanto o forno se encontrava inicialmente a 120 °C (nos primeiros 7 minutos), e por cada minuto que passava foi aumentada em 10 °C até atingir os 170 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio. A separação e identificação dos diferentes AGV (acético, propiónico, butírico, isobutírico e isovalérico) foram feitas num aparelho Perkin-Helmer, por cromatografia em fase gasosa, utilizando como padrão interno o ácido metil valérico.

3.4.2 – Determinação da Actividade Enzimática Microbiana

Após o abate foram retiradas amostras dos conteúdos do ceco e do cólon para frascos onde previamente se colocaram 10 ml de uma solução tampão fosfato (pH 6), sendo em seguida conservadas a -80 °C. Antes da sua utilização as amostras foram sujeitas a 2 ciclos de congelação e descongelação, de modo a promover a ruptura das membranas celulares. Depois, cada amostra foi submetida a um ciclo de sonicações (sonicador Bandelin Sonoplus) de 4 min, que consistia em 30 s de sonicação seguidos de 30 s de repouso, sempre em meio fresco. De seguida, procedeu-se à centrifugação (centrifuga Beckman J2-HS) das amostras a 15000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi recolhido em duplicado para as 3 enzimas (xilanase, pectinase, celulase), para tubos *ependorf*, e imediatamente congelado a -20 °C. A determinação da actividade enzimática decorreu de acordo com o método de Jehl *et al.* (1996). Foram utilizados tubos de ensaio contendo 5,25 ml do respectivo substrato (Xilana Sigma X-0502 para a enzima xilanase, Pectina de citrinos Sigma P-9135 para a enzima pectinase, Carboximetilcelulose Sigma C-5678 para a enzima celulase) e 1,575 ml de solução tampão fosfato (pH 6), aos quais se adicionou 5,25 µl de amostra, sendo posteriormente colocados em banho-maria a 39 °C. Nos tempos de incubação estudados (0, 30 e 60 min) foram pipetados 700 µl do conteúdo dos tubos de ensaio para os *ependorfs* que continham igual volume de DNSA (3,5 ácido-dinitrosalicílico) activado (1 ml de sulfato de sódio e 20 µl de glucose por cada 100 ml de DNSA), o que juntamente com a colocação em gelo, fez com que a reacção parasse. Em seguida, os *ependorfs* foram colocados em banho-maria a 100 °C durante 20 min. Posteriormente foram arrefecidos para que os açúcares redutores libertados adquirissem cor e pudessem ser doseados por espectrofotometria. A leitura da absorvância (575 nm de comprimento de onda) foi feita num espectrofotómetro (Hitachi U-2001 Spectrophotometer).

3.4.3 – Análise Histológica da Mucosa Intestinal

A análise histológica da mucosa intestinal consistiu na medição da profundidade das criptas e do comprimento e largura das vilosidades intestinais do duodeno, do jejuno e do íleo. As amostras recolhidas após o abate foram fixadas em formol tamponado a 10% e processadas para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 7 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e posteriormente observados ao microscópio utilizando uma objectiva de 10x. Foram tiradas fotografias necessárias para reunir um número mínimo de 10 criptas e 10 vilosidades por segmento e por animal, utilizando uma câmara digital (Olympus DP11) incorporada no microscópio (Olympus BX511). As imagens recolhidas foram posteriormente descarregadas para o computador e analisadas com o software Olympus DP Soft, para medição dos parâmetros.

3.4.4 – Medição do pH dos Conteúdos do Tracto Gastrointestinal

A medição do pH foi feita imediatamente após o abate de cada animal. As amostras retiradas do conteúdo do estômago, do íleo, do ceco e do cólon foram homogeneizadas e medidas com recurso ao aparelho WTW pH 522.

3.4.5 – Determinações Analíticas a partir dos Regimes Alimentares, Fezes e Urina

- Matéria seca (MS): obtida através da secagem da amostra em estufa a 103°C, sendo expressa em percentagem de massa da amostra.

$$MS (\%) = \frac{md}{ma} \times 100$$

em que:

ma – massa (g) de amostra antes da secagem

md – massa (g) de amostra depois da secagem

- Cinza: obtida através da incineração da amostra numa mufla a 550 °C.

$$Cinza (\% \text{ de } MS) = \frac{md}{ma} \times 100$$

em que:

ma – massa (g) de amostra antes da incineração

md – massa (g) de amostra depois da incineração

- A Fibra Neutro-Detergente (NDF), a Fibra Ácido-Detergente (ADF) e a Lenhina Ácido-Detergente (ADL) foram determinadas utilizando o sistema Fibertec de acordo com o método de Van Soest *et al.* (1991).
- Azoto: utilizou-se o sistema de digestão 1015 Digester Tecator e a unidade de destilação 1026 Tecator, com posterior titulação manual. Para a fórmula entrou-se em linha de conta com o método de Kjeldahl para o cálculo do azoto total.

$$\text{Azoto (\%)} = \left(\frac{(v1 - v2) \times N \times 14,007 \times 10^{-8}}{m} \right) \times 100$$

em que:

v1 – volume de ácido clorídrico consumido na titulação da amostra

v2 – volume de ácido clorídrico consumido na titulação do ensaio em branco

N – normalidade da solução de ácido clorídrico utilizada

m – massa (g) da amostra

Para determinar a PB, multiplica-se o valor de azoto obtido por 6,25, considerando que toda a proteína contém 16% de azoto. O teor de proteína foi calculado no regime alimentar, nas fezes e na urina.

3.5 – Parâmetros Avaliados

3.5.1 – Performances Zootécnicas

- Alimento ingerido (AI): calculado pela diferença entre a quantidade de alimento fornecida e a quantidade refugada, após correcção da MS dos refugos.

$$AI = \text{Alimento Fornecido (g)} - \text{Refugo(g)}$$

- Ganho médio diário (GMD): razão entre o ganho de peso e o intervalo de tempo entre duas pesagens.

$$GMD = \frac{\text{Ganho de Peso (g)}}{\text{Intervalo de tempo (dias)}}$$

- Índice de conversão alimentar (IC): quantidade de alimento ingerida pelo animal para aumentar 1 kg de peso vivo.

$$IC = \frac{\text{Alimento Ingerido (kg)}}{\text{Ganho de Peso (kg)}}$$

3.5.2 – Digestibilidade Fecal Aparente

A digestibilidade fecal aparente é definida como a percentagem de nutriente ingerida não excretada nas fezes, ou seja, que é absorvida. É quantificada pelo coeficiente de utilização digestiva (CUD) e foi calculada para a MS, cinza, PB, NDF, ADF e ADL.

$$CUD_{ap} = \left(\frac{ing - exc. fezes}{ing} \right) \times 100$$

3.5.3 – Balanço Azotado

- Coeficiente de retenção azotada (CRN): representa o azoto retido em relação ao azoto absorvido.

$$CRN = \frac{N\ ing - N\ exc.\ fezes - N\ exc.\ urina}{N\ ing - N\ exc.\ fezes} \times 100$$

- Coeficiente de utilização prático do azoto (CUPN): representa o azoto retido em relação ao azoto ingerido.

$$CUPN = \frac{N\ ing - N\ exc.\ fezes - N\ exc.\ urina}{N\ ing} \times 100$$

3.6 – Tratamento Estatístico dos Dados

O número de unidades experimentais foi reduzido para 21 devido à morte de 3 leitões durante o ensaio.

Os resultados das performances de crescimento, consistência fecal, digestibilidade e balanço azotado dos leitões foram comparados por análise de variância utilizando o efeito do regime e do período experimental como variáveis independentes. Esta análise de variância foi realizada pelo procedimento MIXED do programa SAS (SAS, 1991) devido à existência de medidas repetidas no tempo (Littell *et al.*, 1998). Os restantes resultados foram comparados por análise de variância considerando-se o regime como único factor de variação, recorrendo-se ao procedimento GML do programa SAS.

Quando os valores de F da análise de variância foram significativos ($P < 0,05$) as médias ajustadas foram comparadas pelo teste da mais pequena diferença significativa.

4 - Resultados

4.1 – Performances Zootécnicas

Na tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos para as performances zootécnicas. O peso vivo médio inicial dos leitões foi de 6,38 kg (\pm 0,58 kg) e o peso vivo médio final foi de 22,29 kg (\pm 3,84 kg). O peso vivo final teve tendência ($P=0,0921$) para ser superior nos leitões alimentados com o regime SW02 em comparação com os que receberam RB. Quanto à ingestão de alimento (g/dia) verificou-se também uma tendência ($P=0,0897$) para que este parâmetro fosse superior no grupo de animais que recebeu o regime SW02 comparativamente ao grupo de RB. O mesmo aconteceu relativamente ao ganho médio diário ($P=0,0923$). Pelo contrário, a inclusão das misturas de óleos essenciais e ácidos orgânicos na dieta não influenciou significativamente o índice de conversão ($P=0,4592$).

O índice fecal avalia a consistência das fezes e quanto menor é o seu valor numérico, maior é a consistência das mesmas. Observando os dados relativos a este parâmetro, verifica-se que houve uma grande influência do período ($P<0,0001$), tendo as fezes uma maior consistência a partir da terceira semana experimental. Pelo contrário a composição do regime experimental não influenciou significativamente ($P=0,7243$) a consistência das fezes.

Tabela 10 – Efeito da composição do regime e do período experimental nas performances de crescimento e na consistência fecal durante o ensaio

	Regime			Período					Regime ³	Período ³	DP ⁴
	RB	SW01	SW02	1	2	3	4	5			
Peso Inicial (kg)	6,29	6,46	6,40	-	-	-	-	-		-	0,58
Peso Final (kg)¹	19,87	23,00	24,00	-	-	-	-	-	0,0921	-	3,84
Ingestão											
g/dia	617	725	755	-	-	-	-	-	0,0897	-	125
g/dia/kg	47,1	49,1	49,7	-	-	-	-	-	0,3344	-	3,4
g/dia/kg ^{0.75}	89,4	96,0	98,1	-	-	-	-	-	0,1263	-	8,4
Ganho Médio Diário (g/day⁻¹)	388	473	503	-	-	-	-	-	0,0923	-	106
Índice de Conversão	1,66	1,54	1,51	-	-	-	-	-	0,4592	-	0,23
Índice Fecal²	1,021	0,981	1,090	1,986 ^a	1,300 ^b	0,693 ^c	0,591 ^c	0,584 ^c	0,7243	<0,0001	0,887

¹ No final do período experimental

² Análise realizada pelo procedimento MIXED do programa SAS para considerar as medidas repetidas nos diferentes períodos experimentais

0= Normais, 1= Fezes moles, 2 = Diarreia moderada, 3 = Diarreia severa

³ Valores de P para os efeitos: Regime e período

⁴ DP : Desvio padrão

4.2 – Digestibilidade Fecal Aparente

A composição do regime afectou significativamente a digestibilidade fecal aparente das fracções NDF e ADF ($P<0,05$), exercendo ainda uma tendência sobre a digestibilidade fecal aparente da MS ($P=0,0533$) e da PB ($P=0,0607$) (tabela 14). A digestibilidade fecal aparente da fracção NDF sofreu um aumento de 10,2 e 9,8 pontos percentuais no grupo de animais que recebeu o regime SW01, comparativamente aos grupos RB e SW02, respectivamente. A digestibilidade da fracção ADF foi também melhorada quando os animais receberam o regime SW01 (+14,2 e +19,1 pontos percentuais em relação ao grupo RB e SW02, respectivamente). Os melhores resultados da digestibilidade fecal aparente da MS e da proteína bruta foram também obtidos nos animais que receberam o regime suplementado com a mistura SW01 (MS: +2,7 e +3,3 pontos percentuais em relação a RB e SW02, respectivamente; PB: +1,4 e +5,3 pontos percentuais relativamente a RB e SW02, respectivamente).

A idade dos leitões (período) afectou significativamente ($P<0,05$) a digestibilidade fecal aparente da cinza, da PB e das fracções NDF, ADF e ADL, e exerceu uma tendência sobre a digestibilidade fecal aparente da MS ($P=0,0669$). Os valores dos CUDap da MS, da cinza e da PB são mais elevados no período de recolhas 2 (46-50 dias de idade). O período foi também significativamente importante ($P<0,05$) no caso da fracção fibrosa do alimento, verificando-se uma diminuição do CUDap do NDF, do ADF e do ADL do período 1 para o período 2.

Tabela 11 – Efeito da composição do regime experimental e do período na digestibilidade fecal aparente dos principais constituintes do regime

	RB	SW01	SW02	Período 1*	Período 2*	Regime ¹	Período ¹	RxP ¹	DPR ²
Ingestão (g/d)	557	623	669	311	921	0,3838	<0,0001	0,0995	356
CUDap (%)									
Matéria Seca	84,2	86,9	83,6	83,9	86,0	0,0533	0,0669	0,0293	3,8
Cinza	59,4	63,8	56,2	56,9	62,7	0,1674	0,0498	0,0278	10,24
Proteína Bruta	81,6	83,0	77,7	79,0	82,5	0,0607	0,0474	0,0088	6,3
NDF	57,9 ^a	68,1 ^b	58,3 ^a	66,8	56,1	0,0388	0,0002	0,0274	11,6
ADF	35,2 ^a	49,4 ^b	30,3 ^a	46,9	29,7	0,0099	<0,0001	0,6052	16,1
ADL	20,5	33,0	21,7	37,1	13,0	0,1874	0,0001	0,0907	21,9

* Período 1: leitões com 25-29 dias de idade; Período 2: leitões com 46-50 dias de idade

¹ Valores de P para os efeitos: regime, período e interacção regime x período

² DPR: Desvio padrão residual

4.3 – Balanço Azotado

Analisando os valores apresentados na tabela 15, verifica-se que o regime não exerceu efeito significativo ($P>0,05$) sobre os parâmetros estudados para avaliar o balanço azotado. No entanto, verifica-se que numericamente o regime SW02 foi o que conduziu a uma maior ingestão azotada, sendo o SW01 o que apresenta maiores valores de azoto retido.

O período influenciou significativamente ($P<0,05$) o balanço de azoto, sendo o período 2 (leitões com 46-50 de idade) o que apresenta valores superiores de azoto ingerido, azoto retido, coeficiente de retenção azotada (CRN) e coeficiente de utilização prático do azoto (CUPN).

Pode ainda verificar-se que a interacção entre o regime e o período atingiu o limiar de significância estatística para a quantidade de azoto ingerida diariamente (g/kg) ($P=0,0468$) e na quantidade de azoto ingerida diariamente por kg de peso metabólico ($P=0,0276$). Quanto aos restantes parâmetros estudados não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$).

Tabela 12 – Efeito da composição do regime experimental e do período nos parâmetros do balanço azotado dos leitões

	RB	SW01	SW02	Período 1*	Período 2*	Regime ¹	Período ¹	RxP ¹	DPR ²
N ingerido									
g/dia	17,95	20,27	21,69	10,07	29,86	0,3433	<0,0001	0,0754	11,45
g/dia/kg	1,71	1,78	1,82	1,43	2,11	0,3820	<0,0001	0,0468	0,40
g/dia/kg. ^{0.75}	3,04	3,22	3,35	2,33	4,08	0,2766	<0,0001	0,0276	0,98
N retido									
g/dia	8,55	10,26	9,37	2,57	16,21	0,7623	<0,0001	0,4320	8,31
g/dia/kg	0,74	0,77	0,71	0,35	1,13	0,9184	<0,0001	0,6681	0,49
g.day.kg. ^{0.75}	1,36	1,46	1,34	0,58	2,19	0,8975	<0,0001	0,6070	0,99
CRN (%)	49,3	45,8	48,0	29,9	65,4	0,9405	0,0012	0,5440	28,2
CUPN (%)	40,3	38,3	36,9	23,0	54,0	0,8797	0,0005	0,7079	23,3

* Período 1: leitões com 25-29 dias de idade; Período 2: leitões com 46-50 dias de idade

¹ Valores de P para os efeitos: regime, período e interação regime x período

² DPR: Desvio padrão residual

4.4 – Desenvolvimento do Tracto Gastrointestinal

Analisando o efeito do regime no desenvolvimento do tracto gastrointestinal dos leitões (tabela 11), verifica-se que a inclusão das misturas de óleos essenciais e ácidos orgânicos não teve influência no peso (g/kg de PV) do estômago cheio ou vazio ($P=0,7502$ e $P=0,1527$, respectivamente), do pâncreas ($P=0,9358$), do fígado ($P=0,8176$), da vesícula biliar ($P=0,1747$) nem do baço ($P=0,5990$).

Quanto ao intestino delgado, verifica-se uma tendência para que o peso cheio ($P=0,0776$) e vazio ($P=0,0635$) deste órgão apresente o valor menor nos leitões que receberam o regime suplementado com a mistura SW02 e o valor maior no grupo que recebeu a mistura SW01, tendo o grupo RB os valores intermédios. Não se verificam diferenças significativas quanto ao comprimento (m/kg) do intestino delgado ($P=0,2018$).

Observando os resultados relativos ao peso cheio e vazio do intestino grosso, verifica-se que não houve influência do regime sobre estes parâmetros ($P>0,05$). No entanto, o comprimento deste órgão apresenta valores significativamente menores ($P=0,0413$) no grupo que recebeu o regime SW02, comparativamente aos outros grupos.

Tabela 13 – Efeito da composição do regime alimentar no peso do tracto gastrointestinal dos leitões ao abate (g/kg de PV)

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
Estômago					
Cheio	18,5	15,4	16,0	0,7502	8,3
Vazio	11,0	8,5	8,0	0,1527	3,0
Intestino Delgado					
Cheio	63,4	64,6	53,6	0,0776	9,2
Vazio	47,0	47,6	42,5	0,0635	4,0
Comprimento (m/kg)	0,88	0,79	0,73	0,2018	0,16
Intestino Grosso					
Cheio	35,2	38,1	30,9	0,2109	7,0
Vazio	19,8	18,2	16,1	0,1162	3,3
Comprimento (m/kg)	0,14 ^a	0,13 ^{ab}	0,10 ^b	0,0413	0,03
Pâncreas	2,59	2,57	2,52	0,9358	0,36
Fígado	27,7	27,0	27,8	0,8176	2,44
Vesícula Biliar	1,31	1,05	0,98	0,1747	0,34
Baço	2,79	2,74	3,06	0,5990	0,62

¹ Valores de P para o efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

4.5 – Conteúdos do tracto gastrointestinal: determinação da matéria seca (MS) e do pH

A composição do regime alimentar dos leitões não exerceu nenhuma influência estatisticamente significativa ($P>0,05$) no teor de MS dos conteúdos intestinais (tabela 12), apesar do teor de MS do íleo e do ceco ser numericamente inferior no grupo SW01 e o teor de MS do cólon ser numericamente inferior no grupo SW02.

Relativamente aos valores de pH medidos no estômago, íleo, ceco e cólon, também não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os 3 grupos de animais.

Tabela 14 – Efeito da composição do regime experimental sobre o teor de matéria seca e o pH dos conteúdos do tracto gastrointestinal dos leitões

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
Matéria Seca (%)					
Íleo	2,78	2,59	2,77	0,8962	0,81
Ceco	8,44	6,44	8,64	0,5325	3,81
Cólon	19,89	17,85	17,11	0,6714	6,18
pH					
Estômago	1,86	1,87	1,85	0,9921	0,32
Íleo	7,10	6,98	7,09	0,1069	0,11
Ceco	6,63	6,85	6,91	0,2843	0,35
Cólon	7,00	7,05	7,10	0,5408	0,17

¹ Valores de P para o efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

4.6 – Morfologia da Mucosa Intestinal

Na tabela 13 apresentam-se os resultados obtidos para o efeito da utilização das duas misturas de óleos essenciais e ácidos orgânicos sobre a altura e largura das vilosidades, profundidade das criptas e rácio entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo.

No que diz respeito à largura das vilosidades (μm) do duodeno, verifica-se que os animais do grupo SW01 apresentam valores significativamente superiores ($P=0,0379$) aos do grupo RB. Pode ainda observar-se que a largura das vilosidades do jejuno foi

tendencialmente maior ($P=0,0779$) quando os animais receberam o regime SW01. A largura das vilosidades do íleo não foi significativamente influenciada ($P>0,05$) pelo regime.

Quanto aos valores obtidos para a altura das vilosidades e para a profundidade das criptas nos três segmentos do intestino delgado, não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os 3 regimes experimentais.

Observando os valores obtidos para o rácio entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas no íleo, verifica-se uma tendência para que este parâmetro aumente ($P=0,0845$) com a inclusão das misturas SW01 e SW02 no regime. Nos restantes segmentos do intestino delgado as diferenças não são significativas ($P>0,05$).

Tabela 15 – Efeito da composição do regime experimental na morfologia da mucosa intestinal dos leitões

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
Altura vilosidades (μm)					
Duodeno	326	340	331	0,9029	55
Jejuno	380	376	395	0,8406	61
Íleo	320	335	334	0,8890	67
Largura vilosidades (μm)					
Duodeno	164 ^a	200 ^b	178 ^{ab}	0,0379	24
Jejuno	152	173	149	0,0779	19
Íleo	151	168	156	0,3935	23
Profundidade criptas (μm)					
Duodeno	367	365	374	0,8870	39
Jejuno	307	325	305	0,6684	43
Íleo	299	270	264	0,2182	39
Altura vilosidade/profundidade cripta					
Duodeno	0,89	0,96	0,88	0,5887	0,14
Jejuno	1,26	1,18	1,28	0,7226	0,23
Íleo	1,07	1,24	1,25	0,0845	0,17

¹ Valores de P para o efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

4.7 – Actividade Enzimática Microbiana

A tabela 16 mostra os valores obtidos para a actividade das enzimas microbianas xilanase, pectinase e celulase no ceco e cólon dos leitões. Foram verificadas diferenças significativas entre os regimes no que diz respeito à actividade da celulase microbiana no ceco ($P=0,0027$). Esta foi reduzida em cerca de 65% com o regime SW01 e cerca de 51% com o regime SW02, comparativamente ao regime RB. Verificou-se ainda a existência de uma tendência no efeito do regime sobre a actividade da xilanase ($P=0,0931$) e da pectinase ($P=0,0831$) no ceco (comparativamente ao regime base, tanto o regime SW01 como o regime SW02 levaram a uma redução da actividade da xilanase e a um aumento da actividade da pectinase).

No cólon, embora a actividade das 3 enzimas microbianas não tenha sido significativamente afectada pelo regime ($P>0,05$), verifica-se que foi numericamente menor nos regimes SW01 e SW02, em comparação com o regime RB ($P=0,0571$ para a xilanase; $P=0,2628$ para a pectinase; $P=0,2545$ para a celulase).

Tabela 16 – Efeito da composição do regime experimental na actividade das enzimas microbianas (mg/ml) nos conteúdos do ceco e do cólon dos leitões

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
Ceco					
Xilanase	161,2	155,4	88,6	0,0931	65,1
Pectinase	181,1	219,8	190,2	0,0831	30,7
Celulase	112,2 ^a	39,7 ^b	54,7 ^b	0,0027	35,6
Cólon					
Xilanase	206,2	196,9	111,1	0,0571	76,1
Pectinase	255,4	225,2	194,1	0,2628	69,8
Celulase	123,9	100,1	83,5	0,2545	45,8

¹ Valores de P para o efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

4.8 – Ácidos Gordos Voláteis (AGV) nos conteúdos intestinais

Íleo

Através da análise dos teores de AGV nos conteúdos íleais (tabela 17), verifica-se que o regime afectou significativamente a produção de ácido acético ($P=0,0225$), propiónico ($P=0,0187$), butírico ($P=0,0015$) e isobutírico ($0,0043$). O teor total de AGV foi também influenciado significativamente ($P=0,0051$), sendo que o regime SW01 levou a uma redução de 54% e o regime SW02 a uma redução de 50%, comparativamente ao regime de controlo.

No que diz respeito às proporções molares entre os diferentes AGV, observa-se que a proporção entre o ácido acético e o propiónico apresenta diferenças significativas ($P=0,0167$) entre os regimes, sendo menor no regime SW02 em comparação com o regime RB. Verifica-se ainda uma tendência ($P=0,0691$) para que a proporção entre os ácidos propiónico e butírico seja superior no grupo SW02, comparativamente aos restantes grupos. Quanto às restantes proporções não se observam diferenças significativas entre regimes ($P>0,05$).

Tabela 17 – Efeito da composição do regime experimental no teor e na proporção molar dos AGV nos conteúdos íleais

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
AGV (mmol.l⁻¹) *					
C2	2,044 ^a	0,959 ^b	1,142 ^b	0,0225	0,723
C3	0,204 ^a	0,086 ^b	0,064 ^b	0,0187	0,092
C4	0,309 ^a	0,111 ^b	0,011 ^b	0,0015	0,136
IC4	0,137 ^a	0,049 ^b	0,0467 ^b	0,0043	0,051
IC5	0,096	0,086	0,133	0,2880	0,055
Total	2,790 ^a	1,292 ^b	1,397 ^b	0,0051	0,848
Proporção molar					
C2:C3	10,128 ^a	8,469 ^{ab}	4,944 ^b	0,0167	1,905
C2:C4	7,642	5,658	7,037	0,5877	2,759
C3:C4	0,774	0,671	5,818	0,0691	0,270
(C2:C3+C4)	4,158	4,664	5,641	0,6091	2,162
(C2:total)	0,726	0,771	0,773	0,6046	0,100

¹ Valores de P para efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

* C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico, IC5: Isovalérico

Ceco

Neste segmento do intestino delgado, verifica-se que o teor total de AGV ($P=0,0291$), assim como o teor de ácido isovalérico ($P=0,0282$) foram influenciados significativamente pelo regime, aumentando com a inclusão da mistura SW02 (tabela 18). O efeito regime exerceu ainda uma tendência sobre a produção de ácido acético ($P=0,0576$) e de ácido butírico ($P=0,0650$), verificando-se um aumento nos grupos SW01 e SW02 relativamente ao grupo RB.

Relativamente às proporções entre os vários AGV, apenas a proporção entre os ácidos propiónico e butírico apresenta diferenças significativas entre os regimes (menor nos regimes SW01 e SW02 comparativamente ao regime RB).

Tabela 18 – Efeito da composição do regime experimental no teor e na proporção molar dos AGV nos conteúdos do ceco

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
AGV (mmol.l⁻¹) *					
C2	15,08	17,25	21,80	0,0576	5,07
C3	7,51	7,54	8,68	0,6014	2,46
C4	2,97	3,10	5,35	0,0650	1,99
IC4	1,52	1,21	1,38	0,6409	0,60
IC5	0,69 ^a	0,93 ^{ab}	1,17 ^b	0,0282	0,31
Total	27,77 ^a	30,02 ^{ab}	38,40 ^b	0,0291	7,23
Proporção molar					
C2:C3	2,11	2,50	2,54	0,3879	0,65
C2:C4	5,88	4,41	4,20	0,2015	1,79
C3:C4	2,60 ^a	1,61 ^b	1,76 ^b	0,0306	0,64
(C2:C3+C4)	1,58	1,63	1,54	0,9261	0,41
(C2:total)	0,55	0,57	0,56	0,7875	0,07

¹ Valores de P para efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

* C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico, IC5: Isovalérico

Cólon

Analisando a tabela 19, verifica-se que o teor total de AGV ($P=0,0166$), o teor de ácido acético ($P=0,0327$) e o teor de ácido isobutírico ($P=0,0349$) são significativamente menores no regime SW01, em relação ao regime RB (-25%, -26% e -39%, respectivamente). O teor de ácido propiónico não apresenta diferenças significativas entre os regimes SW01 e SW02, mas apresenta diferenças significativas entre estes regimes e o regime de controlo ($P=0,0065$).

Nenhuma das proporções entre os diferentes AGV apresenta diferenças significativas ($P>0,05$), embora a proporção entre os ácidos propiónico e butírico seja tendencialmente afectada pelo regime ($P=0,0630$), sendo maior no regime de controlo comparativamente aos restantes regimes.

Tabela 19 – Efeito da composição do regime experimental no teor e na proporção molar dos AGV nos conteúdos do cólon

	RB	SW01	SW02	Regime ¹	DPR ²
AGV (mmol.l⁻¹) *					
C2	19,96 ^a	14,77 ^b	16,28 ^{ab}	0,0327	3,502
C3	7,24 ^a	5,03 ^b	5,72 ^b	0,0065	1,161
C4	5,43	4,69	5,68	0,2080	0,991
IC4	1,68 ^a	1,031 ^b	1,53 ^{ab}	0,0349	0,434
IC5	1,39	1,19	2,14	0,1586	0,905
Total	35,70 ^a	26,72 ^b	31,34 ^{ab}	0,0166	5,176
Proporção molar					
C2:C3	2,82	2,91	2,83	0,9092	0,439
C2:C4	3,79	3,20	2,97	0,2449	0,941
C3:C4	1,36	1,10	1,03	0,0630	0,266
(C2:C3+C4)	1,59	1,52	1,44	0,5863	0,293
(C2:total)	0,56	0,55	0,52	0,2435	0,049

¹ Valores de P para efeito do regime

² DPR: Desvio padrão residual

* C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico, IC5: Isovalérico

5 - Discussão

5.1 – Performances Zootécnicas

A análise dos resultados mostra que nenhuma das duas misturas de óleos essenciais e ácidos orgânicos melhorou significativamente os parâmetros de crescimento, embora o peso vivo final, a ingestão diária de alimento e o ganho médio diário de peso tenham sido numericamente superiores nos regimes suplementados com os dois aditivos. Também nos estudos de Manzanilla *et al.* (2004), Utiyama (2004) e Oetting *et al.* (2006), em que se adicionaram extractos vegetais ao regime de leitões (pós-desmame) não se verificaram diferenças significativas em relação ao regime base. Do mesmo modo, a adição de ácido fumárico ou ácido málico ao regime, estudada por Owusu-Asiedu *et al.* (2003), Radecki *et al.* (1988) e Krause *et al.* (1994) não melhorou significativamente as performances zootécnicas dos leitões. Resultados contrários foram encontrados por Gollnisch *et al.* (2001) e Wald *et al.* (2001) citados por Franz *et al.* (2010) os quais obtiveram uma melhoria significativa no peso vivo, na ingestão de alimento e no ganho médio de peso, quando adicionaram os óleos essenciais da canela, do cravo-da-Índia ou do orégão ao regime alimentar dos leitões. Também a inclusão de ácido fumárico no alimento para leitões recém-desmamados, nos estudos de Edmonds *et al.* (1985) e Giesting & Easter (1985), resultou numa melhoria do ganho médio de peso.

O efeito dos extractos vegetais e dos ácidos orgânicos nas performances de crescimento dos leitões parece pois complexo, dependendo os resultados da composição do regime base, do nível de ingestão de alimento, do tipo e nível de inclusão dos óleos essenciais e ácidos orgânicos, da idade dos leitões, dos padrões de higiene e das condições ambientais (Franz *et al.*, 2010; Blank *et al.*, 1999; Mroz, 2005; Pastuszewska *et al.*, 2007).

Relativamente ao índice fecal verifica-se que a idade dos leitões, traduzida pelo período experimental, teve uma influência significativa. As fezes foram apresentando uma consistência normal à medida que se aproximava o final do ensaio com maior evidência a partir da terceira semana, o que traduz que a adaptação dos animais ao regime alimentar demorou 2 a 3 semanas. A grande incidência de diarreias que ocorreu após o desmame pode também ser explicada pelo stress sofrido pelos leitões quando foram separados da porca, durante o transporte e na adaptação ao novo ambiente, que pode causar alterações importantes a nível morfológico e histológico, deixando-os mais expostos às perturbações intestinais (Pluske *et al.*, 2007, e Spreeuwenberg, 2002, citados por Nofrarías *et al.*, 2006).

5.2 – Digestibilidade Fecal Aparente e Balanço Azotado

As diferenças verificadas na digestibilidade da MS, entre os 3 regimes, traduzem as diferenças no CUD da PB e do NDF, tendo os melhores resultados sido obtidos com o regime SW01. O menor CUD da MS no regime SW02 resultou essencialmente do menor CUD da PB, valor esse que é difícil de explicar. Nos estudos de Utiyama (2004) e Oetting *et al.* (2006) a inclusão de óleos essenciais na dieta de leitões também originou maior digestibilidade aparente da MS. Por outro lado, os estudos de Blank *et al.* (1999) e Gabert & Sauer (1995) mostram que a adição de ácido fumárico ao regime melhorou a digestibilidade aparente da PB. O facto do regime SW01 ter na sua constituição ácidos orgânicos, poderia ajudar a explicar a obtenção de melhores digestibilidades, comparativamente ao regime base, uma vez que seria de esperar que estes originassem um decréscimo do pH gástrico, compensando a baixa produção de HCl, resultando num aumento da actividade das enzimas proteolíticas. No entanto, os ácidos utilizados (fumárico e málico), tal como a maioria dos ácidos orgânicos, são considerados ácidos fracos, não tendo um grande poder acidificante. Assim, a sua acção no decréscimo do pH pode não ser muito significativa. Também o efeito positivo que os óleos essenciais podem exercer sobre a produção de secreções digestivas e sobre a actividade enzimática, pode ajudar a explicar os resultados obtidos (Platel & Srinivasan, 2004). Contudo, verifica-se que a diferença de digestibilidade entre os regimes SW01 e SW02 é maior do que a diferença entre estes regimes e o regime base, o que é difícil de explicar.

Verifica-se facilmente que a mistura SW01 fornece maior quantidade de ácidos orgânicos mas menor quantidade de óleos essenciais, que a mistura SW02. De notar também que em ambas as misturas o ácido fumárico está presente em maior quantidade. Tendo em conta as diferenças de composição das duas misturas e a quantidade de alimento ingerida por dia em média ao longo do ensaio, foi possível calcular as quantidades de ácido fumárico, ácido málico e óleos essenciais ingeridas diariamente pelos leitões. Assim, os leitões que receberam o regime SW01 ingeriam diariamente, em média, 0,308 g de ácido fumárico, 0,062 g de ácido málico e 0,020 g de óleos essenciais. Por sua vez, os leitões suplementados com a mistura SW02 ingeriam 0,283 g de ácido fumárico, 0,057 g de ácido málico e 0,038 g de óleos essenciais, diariamente. Analisando as quantidades de óleos essenciais ingeridas pelos leitões no estudo de Oetting *et al.* (2006) (grupo 1: 0,413 g/dia; grupo 2: 0,753 g/dia; grupo 3: 1,275 g/dia), verifica-se que estas são superiores às quantidades ingeridas pelos leitões do presente trabalho. Também no estudo de Giesting & Easter (1985), os leitões ingeriram maiores quantidade de ácido fumárico (grupo 1: 4,84 g/dia; grupo 2: 8,9 g/dia; grupo 3: 14,79 g/dia; grupo 4: 20 g/dia) do que neste estudo. Contudo, neste estudo foi utilizada uma forma protegida de ácidos orgânicos e óleos

essenciais, o que permite que sejam fornecidas menores quantidades destes aditivos, comparativamente aos estudos atrás mencionados, onde foram utilizadas formas livres. Assim, a ausência de melhoria na maioria dos parâmetros analisados, com os regimes SW01 e SW02, não permite comprovar a eficácia do processo de encapsulamento na eficiência biológica dos compostos activos utilizados.

A digestibilidade fecal aparente da MS, da fracção mineral e da PB foi superior no período 2, ou seja, quando os animais eram mais velhos, traduzindo a melhor adaptação dos leitões ao regime, quer a nível morfológico, quer a nível enzimático. Pelo contrário, a digestibilidade fecal aparente da fracção fibrosa diminui do período 1 para o período 2, o que pode ser explicado pelo facto de a ingestão ter aumentado de uma forma que supera a capacidade de degradação de material vegetal por parte do animal. Calculando as quantidades de NDF ingeridas e degradadas nos três grupos de animais no período 1 e no período 2, verifica-se que, embora a digestibilidade seja menor no período 2, em termos absolutos, os animais degradaram quantidades superiores de NDF. Apresentando os valores calculados para o NDF verifica-se que, em média, no período 1 degradaram 23,7 g/dia no grupo RB, 23,4 g/dia no SW01 e 21,8 g/dia no SW02 e no período 2 degradaram 59,0 g/dia no grupo RB, 58,1 g/dia no SW01 e 54,4 g/dia no SW02.

Analisando os resultados, verifica-se que não houve efeitos significativos nem mesmo tendências do regime sobre o balanço azotado. A melhoria do balanço azotado verificada no período 2 justifica-se essencialmente pelo aumento da quantidade de N ingerido (quase triplicou). Os valores do coeficiente de retenção azotada (CRN) e do coeficiente de utilização prático do azoto (CUPN) são valores aparentes que não são corrigidos da excreção endógena de N. Assim, quando a quantidade de N ingerido aumenta, a proporção da fracção endógena na excreção total de N diminui e o CRN e o CUPN aumentam.

5.3 – Desenvolvimento do Tracto Gastrointestinal

A composição do regime não influenciou significativamente o peso de nenhum dos órgãos do sistema digestivo, embora o comprimento do intestino grosso tenha sido menor nos leitões que receberam o regime SW02.

Segundo Utiyama (2004) o menor peso dos intestinos delgado e grosso pode estar relacionado com uma menor produção microbiana de AGV, os quais fornecem boa parte da energia exigida para os enterócitos. Assim sendo, como houve uma menor produção de AGV no íleo dos leitões dos grupos SW01 e SW02 (tabela 17), poderia ter havido uma

menor taxa de replicação celular no epitélio intestinal, levando à redução do peso vazio do intestino delgado. No entanto, os resultados mostram que não existem diferenças significativas quanto ao peso vazio do intestino delgado entre os animais dos três grupos, embora este parâmetro tenha tendência para ser inferior no grupo SW02.

Ainda de acordo com Utiyama (2004) os extractos de plantas podem estimular as secreções pancreáticas e a actividade das enzimas pancreáticas, fazendo aumentar o peso do pâncreas. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho não podem comprovar esta teoria, uma vez que não houve qualquer efeito significativo do regime sobre o peso do pâncreas.

No estudo de Manzanilla *et al.* (2004), a inclusão de extractos vegetais e/ou de ácido fórmico no regime alimentar de leitões levou a um aumento do tempo de retenção gástrico e intestinal, o que prova um possível efeito destes aditivos no trânsito digestivo.

Calculando o peso dos conteúdos digestivos ao abate, verifica-se que no estômago não existem grandes diferenças entre os três regimes (RB: 7,5 g/kg de PV; SW01: 6,9 g/kg de PV; SW02: 8,0 g/kg de PV), enquanto no intestino delgado (RB: 16,4 g/kg de PV; SW01: 17,0 g/kg de PV; SW02: 11,1 g/kg de PV) e grosso (RB: 15,4 g/kg de PV; SW01: 19,9 g/kg de PV; SW02: 14,8 g/kg de PV) o regime SW02 originou menores pesos. Assim, podemos especular que o regime SW02 levou a uma aceleração do trânsito digestivo, mas os resultados do presente ensaio não permitem prová-lo.

5.4 – pH dos Conteúdos Gastrointestinais

Ao contrário do que seria de esperar com a inclusão de ácidos orgânicos na dieta, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas relativamente ao pH gástrico e intestinal dos leitões entre os 3 regimes, existindo vários factores que podem explicar estes resultados. Os valores de pK_a dos dois ácidos usados indicam que estes são ácidos fracos, tendo um baixo poder acidificante. Analisando também a quantidade de ácidos ingerida diariamente pelos leitões (cerca de 0,3 g/dia de ácido fumárico e 0,02-0,05 g/dia de ácido málico) e comparando com as quantidades ingeridas em outros estudos (Giesting & Easter, 1985) pode concluir-se que essas foram baixas, podendo não ser suficientes para que o efeito dos ácidos seja significativo. Também o eventual poder tampão da dieta, assegurado pela fracção mineral e pela proteína, pode ter contribuído para a inexistência do efeito acidificante dos ácidos utilizados.

Uma vez que os ácidos orgânicos estavam microencapsulados seria de esperar que chegassem até aos compartimentos mais distais do tracto digestivo, fazendo descer o seu pH, mas os resultados não o comprovam. Também Piva *et al.* (2007b) não observou

diferenças significativas no pH do íleo, ceco e cólon, quando adicionou uma mistura de ácidos orgânicos e extractos vegetais microencapsulados à deita de leitões, comparativamente ao regime de controlo.

5.5 – Morfologia da Mucosa Intestinal

Tanto os óleos essenciais como os ácidos orgânicos podem exercer um efeito indirecto sobre a histologia intestinal. Estes aditivos exercem um efeito inibidor sobre a colonização e proliferação de microrganismos patogénicos, protegendo a mucosa intestinal da sua acção (Manzanilla *et al.*, 2004; Partanen & Mroz, 1999). Assim, não se verifica a descamação do epitélio intestinal e consequente diminuição da altura das vilosidades, evitando-se a redução da capacidade de absorção.

De todos os parâmetros analisados para avaliar o efeito da composição do regime na morfologia da mucosa intestinal, apenas a largura das vilosidades do duodeno foi significativamente alterada, apresentando valores superiores com o regime SW01. Para além disso, não se verificou uma diminuição da altura das vilosidades, o que juntamente com o aumento da sua largura leva a crer poder haver um aumento da superfície de absorção. Utiyama (2004) observou que a adição de extractos de plantas ao regime de leitões resultou em valores numericamente superiores para a altura das vilosidades e para a relação altura das vilosidades:profundidade das criptas do duodeno e do jejuno. Também Owusu-Asiedu *et al.* (2003) observaram um aumento dos valores relativos aos mesmos parâmetros quando adicionaram ácido fumárico ao regime de leitões. Sendo a razão altura das vilosidades:profundidade das criptas um indicador da saúde intestinal dos leitões, verifica-se que houve uma tendência para que os grupos de animais suplementados tivessem melhores valores para este parâmetro no íleo. Talvez os aditivos utilizados possam ter exercido um efeito inibidor sobre a microflora patogénica existente no íleo.

Importa ainda referir que as amostras da mucosa intestinal foram recolhidas no final do ensaio, cerca de 6 semanas após o desmame, isto é, quando o tracto gastrointestinal dos leitões já está quase totalmente desenvolvido. Assim, não foi possível avaliar a teoria segundo a qual os aditivos estudados são mais eficazes no período imediatamente após o desmame quando o tracto digestivo é ainda imaturo. Esse facto pode ter contribuído para atenuar o efeito potencial dos óleos essenciais e dos ácidos fumárico e málico sobre a morfologia intestinal.

5.6 – Actividade Enzimática Microbiana e AGV nos Conteúdos Intestinais

Em todos os grupos de leitões foi detectada actividade enzimática da xilanase, da pectinase e da celulase, o que é normal uma vez que os animais foram abatidos com cerca de 8 semanas de idade, apresentando já, um sistema digestivo desenvolvido e uma microflora intestinal apta a digerir nutrientes de origem vegetal. Analisando os resultados obtidos para a actividade destas enzimas microbianas verifica-se que, embora apenas a actividade da celulase no ceco tenha sido significativamente afectada pelo regime, quase todas estas enzimas estudadas no ceco e cólon apresentam valores de actividade numericamente menores nos regimes SW01 e SW02 em comparação com o regime base. Isto pode dever-se ao facto de os óleos essenciais e os ácidos orgânicos terem chegado a estes compartimentos do intestino grosso e aí exercerem o seu efeito antimicrobiano diminuindo a população microbiana.

Uma vez que os óleos essenciais e os ácidos orgânicos têm um efeito modulador sobre a população microbiana dos intestinos delgado e grosso, é de esperar que provoquem uma alteração no padrão de AGV produzido. Também a quantidade e a fonte de substrato que chega ao intestino são factores importantes que afectam a produção de AGV (Bergman, 1990 citado por Manzanilla *et al.*, 2004).

Os resultados mostram que o teor de AGV no íleo foi inferior ao teor de AGV no ceco e no cólon, o que se deve ao facto de a população microbiana do íleo dos leitões ser inferior e ter composição diferente da população microbiana do ceco e do cólon (Partanen & Mroz, 1999). A inclusão das misturas SW01 e SW02 originou uma menor concentração dos ácidos acético, propiónico, butírico e isobutírico no íleo. Isto pode ser devido ao efeito positivo que os óleos essenciais e os ácidos orgânicos exercem sobre a multiplicação de microrganismos existentes no íleo como os *Lactobacillus* em detrimento das bactérias produtoras de AGV (por exemplo, *Eubacteria* e *Bacteroidaceae* que produzem principalmente ácido acético, propiónico e butírico) (Castillo *et al.*, 2006; Manzanilla *et al.*, 2004; Partanen & Mroz, 1999).

A inclusão das misturas SW01 e SW02 fez aumentar o teor de AGV no ceco e pelo contrário fez diminuir esse mesmo teor no cólon. Importa referir que o aumento dos AGV no ceco com os regimes SW01 e SW02 não está concordante com a diminuição da actividade das enzimas microbianas (tabela 16), não sendo possível estabelecer um paralelo entre a actividade das enzimas microbianas e o teor de AGV. Isto pode explicar-se pelo facto do teor de AGV em cada momento ser resultado de um balanço entre os AGV produzidos e os AGV absorvidos.

Segundo Partanen & Mroz (1999) os ácidos acético, propiónico e butírico formam-se por degradação da fracção fibrosa da dieta, enquanto os ácidos isobutírico e isovalérico se formam por degradação de compostos proteicos. Analisando os resultados verifica-se que a

quantidade de ácido isobutírico e isovalérico produzida foi muito baixa, e menor que a quantidade de ácido acético, propiónico e butírico produzida, levando a concluir que a degradação de compostos proteicos por parte da microflora intestinal foi baixa.

A proporção molar entre os AGV produzidos pode ser utilizada como um indicador da quantidade e composição dos substratos que são fermentados no íleo, ceco e cólon. No presente trabalho, apenas a proporção entre o ácido acético e o propiónico no íleo e a proporção entre o ácido propiónico e o butírico no ceco foram afectadas significativamente pela composição do regime, sendo ambas mais baixas nos grupos SW01 e SW02 em relação ao grupo de controlo. Assim, pode concluir-se que os resultados sugerem não ter havido alteração na composição dos substratos que chegam aos diferentes compartimentos do tubo digestivo dos leitões que receberam os regimes RB, SW01 e SW02.

6 – Conclusão

A inclusão de óleos essenciais (carvacrol, eugenol e cinamaldeído) e de ácidos orgânicos (fumárico e málico) microencapsulados na dieta de leitões na fase do pós-desmame promoveu uma ligeira melhoria das performances zootécnicas, verificando-se uma tendência para que o peso vivo final, a ingestão de alimento e o ganho médio diário de peso fossem superiores quando os animais foram suplementados. A mistura SW02, que continha menor quantidade de ácidos orgânicos e maior quantidade de óleos essenciais que a SW01, foi a que originou melhores resultados.

Quanto à digestibilidade dos principais constituintes do regime, a mistura SW01 foi a que levou à obtenção de valores numericamente mais elevados.

De modo geral, o uso das duas misturas de óleos essenciais e ácidos orgânicos não alterou significativamente o desenvolvimento do tracto gastrointestinal nem a morfologia da mucosa intestinal.

Relativamente às enzimas microbianas observou-se um ligeiro decréscimo da sua actividade nos leitões suplementados, em comparação com os do grupo de controlo. A actividade fermentativa decresceu no íleo e no cólon e aumentou no ceco, quando as duas misturas SW01 e SW02 foram incorporadas no regime.

Os resultados obtidos neste estudo não permitem confirmar que a inclusão de óleos essenciais e dos ácidos orgânicos fumárico e málico microencapsulados na dieta de leitões seja eficaz na resolução de problemas de crescimento e de distúrbios digestivos que ocorrem na fase do pós-desmame. No entanto, as ligeiras melhorias verificadas em alguns dos parâmetros estudados levam a acreditar que mais estudos devem ser feitos para melhor compreender a acção destes aditivos.

Referências Bibliográficas

- BLANK, R., Mosenthin, R., Sauer, W.C., Huang, S., 1999. *Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs*. Journal of Animal Science, 77:2974-2984.
- BLANK, R., Sauer, W.C., Mosenthin, R., Zentek, J., Huang, S., Roth, S., 2001. *Effect of fumaric acid supplementation and dietary buffering capacity on the concentration of microbial metabolites in ileal digesta of young pigs*. Canadian Journal of Animal Science, 81:345-353.
- BRENES, A., Roura, E., 2010. *Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action*. Animal Feed Science and Technology, 158:1-14.
- CASTILLO, M., Martín-Orúe, S.M., Roca, M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Perez, J.F., Gasa, J., 2006. *The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs*. Journal of Animal Science, 84:2725-2734.
- CANIBE, N., Engberg, R.M., Jensen, B.B., 2001. *An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health*. Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum. Disponível em: [http://poultry.huv.slu.se/chick/organic acids canibe et al.pdf](http://poultry.huv.slu.se/chick/organic%20acids%20canibe%20et%20al.pdf). Acedido em: Maio de 2010.
- DORMAN, H.J.D., Deans, S.G., 2000. *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. Journal of Applied Microbiology, 88:308-316.
- EDMONDS, M.S., Izquierdo O.A., Baker, D.H., 1985. *Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids*. Journal of Animal Science, 60:462-469.
- FALKOWSKI, J.F., Aherne, F.X., 1984. *Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition*. Journal of Animal Science, 58:935-938.
- FRANZ, C., Baser, K.H.C., Windisch, W., 2010. *Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective*. Flavour and Fragrance Journal, 25:327-340.
- FREIRE, J.P.B., 1998. *Maneio alimentar dos leitões: Adaptação digestiva ao regime de desmame*. 1^{as} Jornadas Internacionais de Suinicultura, U.T.A.D., Vila Real, 111-119.
- GABERT, V.M., Sauer, W.C., 1995. *The effect of fumaric acid and sodium fumarate supplementation to diets for weanling pigs on amino acid digestibility and volatile fatty acid concentration in ileal digesta*. Animal Feed Science and Technology, 53:243-254.

- GIESTING, D.W., Easter, R.A., 1985. *Response of starter pigs to supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids*. Journal of Animal Science, 60:1288-1294.
- GIESTING, D.W., Easter, R.A., 1991. *Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs*. Journal of Animal Science, 69: 2497-2503.
- GIESTING, D.W., Roos, M.A., Easter, R.A., 1991. *Evaluation of the effect of fumaric acid and sodium bicarbonate addition on performance of starter pigs fed diets of different types*. Journal of Animal Science, 69:2489-2496.
- GOTTLÖB, R.O., Dritz, S.S., Tokach, M.D., Nelssen, J.L., Goodband, R.D., DeRouchey, J.M., Benz, J.M., Groesbeck, C.N., Sulabo, R.C., 2006. *Effects of dietary calcium formate and malic acid on nursery pig growth performance*. Kansas State University. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. 67-71. Disponível em: <http://hdl.handle.net/2097/1857>. Acedido em: Maio de 2010.
- HANSEN, C.F., Riis, A.L., Bresson, S., Hojbjerg, O., Jensen, B.B., 2007. *Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach*. Livestock Science, 108:206-209.
- HONG, J.W., Kim, I.H., Kwon, O.S., Min, B.J., Lee, W.B., Shon, K.S., 2004. *Influences of plant extract supplementation on performance and blood characteristics in weaned pigs*. Asian-Australian Journal of Animal Science, 17:374-378.
- KASPROWICZ-POTOCKA, M., Frankiewicz, A., Selwet, M., Chilomer, K., 2009. *Effect of salts and organic acids on metabolite production and microbial parameters of piglets' digestive tract*. Livestock Science, 126:310-313.
- KNARREBORG, A., Miquel, N., Granli, T., Jensen, B.B., 2002. *Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of gastrointestinal tract of piglets*. Animal Feed Science and Technology, 99:131-140.
- KONG, X.F., Wu, G.Y., Liao, Y.P., Hou, Z.P., Liu, H.J., Yin, F.G., Li, T.J., Huang, R.L., Zhang, Y.M., Deng, D., Kang, P., Wang, R.X., Tang, Z.Y., Yang, C.B., Deng, Z.Y., Xiong, H., Chu, W.-Y., Ruan, Z., Xie, M.Y., Yin, Y.L., 2007. *Effects of Chinese herbal ultra-fine powder as a dietary additive on growth performance, serum metabolites and intestinal health in early-weaned piglets*. Livestock Science, 108:272-275.

- KRAUSE, D.O., Harrison, P.C., Easter, R.A., 1994. *Characterization of the nutritional interactions between organic acids and inorganic bases in the pig and chick*. Journal of Animal Science, 72:1257-1262.
- LALLÈS, J.P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007. *Weaning – A challenge to gut physiologists*. Livestock Science, 108:82-93.
- LITTELL, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measure data using SAS procedures. Journal of Animal Science, 76:1216-1231.
- MANNERS, M.J., 1976. *The development of digestive function in the pig*. Proceedings of the Nutrition Society, 35:49-55.
- MANZANILLA, E.G., Perez, J.F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., Gasa, J., 2004. *Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs*. Journal of Animal Science, 82:3210-3218.
- MANZANILLA, E.G., Nofrarias, M., Anguita, M., Castillo, M., Perez, J.F., Martín-Orúe, S.M., Kamel, C., Gasa, J., 2006. *Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs*. Journal of Animal Science, 84:2743-2751.
- MARQUARDT, R.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A., Baidoo, S.K., 1999. *Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88⁺ infection in neonatal and early-weaned piglets*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 23:283-288.
- MEUNIER, J.-P., Cardot, J.-M., Gauthier, P., Beyssac, E., Alric, M., 2006. *Use of rotary fluidized-bed technology for development of sustained-release plant extracts pellets: Potential application for feed additive additive delivery*. Journal of Animal Science, 84:1850-1859.
- MEUNIER, J.-P., Cardot, J.-M., Manzanilla, E.G., Wysshaar, M., Alric, M., 2007. *Use of spray-cooling technology for development of microencapsulated capsicum oleoresin for growing pig as an alternative to in-feed antibiotics: A study of release using in vitro models*. Journal of Animal Science, 85:2699-2710.
- MICHIELS, J., Missotten, J., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N., 2007. *In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora*. Livestock Science, 109:157-160.

- MICHIELS, J., Missotten, J.A.M., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N.A., 2009 (a). *In vitro* characterization of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. *Animal Feed Science and Technology*, 151:111-127.
- MICHIELS, J., 2009. *Effect of essential oils on gut bacteria and functionality in the pig*. PhD thesis, Ghent University, Belgium, 282p.
- MONTAGNE, L., Cavaney, F.S., Hampson, D.J., Lallès, J.P., Pluske, J.R., 2004. *Effect of diet composition on postweaning colibacillosis in piglets*. *Journal of Animal Science*, 82:2364-2374.
- MROZ, Z., 2005. *Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs*. *Advances in Pork Production*, 16:169-182.
- NOFRARÍAS, M., Manzanilla, E.G., Pujols, J., Gibert, X., Majó, N., Segalés, J., Gasa, J., 2006. *Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs*. *Journal of Animal Science*, 84:2735-2742.
- NRC, 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10^a ed., Washington D.C., USA, National Academy Press.
- OETTING, L.L., Utiyama, C.E., Giani, P.A., Ruiz, U.S., Miyada, V.S., 2006. *Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35:1389-1397.
- OWUSU-ASIEDU, A., Nyachoti, C.M., Marquardt, R.R., 2003. *Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic Escherichia coli (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic*. *Journal of Animal Science*, 81:1709-1798.
- PARRIS, N., Cooke, P.H., Hicks, K.B., 2005. *Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4788-4792.
- PARTANEN, K.H., Mroz, Z., 1999. *Organic acids for performance enhancement in pig diets*. *Nutrition Research Reviews*, 12:117-145.
- PASTUSZEWSKA, B., Tomaszewska-Zaremba, D., Buraczewska, L., Swiech, E., Taciak, M., 2007. *Effects of supplementing pig diets with tryptophan and acidifier on protein digestion and deposition, and on brain serotonin concentration in young pigs*. *Animal Feed Science and Technology*, 132:49-65.

- PIVA, A., Grilli, E., Fabbri, L., Pizzamiglio, V., Campani, I., 2007 (a). *Free versus microencapsulated organic acids in medicated or not medicated diet for piglets*. *Livestock Science*, 108:214-217.
- PIVA, A., Pizzamiglio, V., Morlacchini, M., Tedeschi, M., Piva, G., 2007 (b). *Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine*. *Journal of Animal Science*, 85:486-493.
- PLATEL, K., Srinivasan, K., 2004. *Digestive stimulant action of spices: A myth or reality?* *Indian Journal of Medical Research*, 119:167-179.
- RADECKI, S.V., Juhl, M.R., Miller, E.R., 1988. *Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance*. *Journal of Animal Science*, 66:2598-2605.
- SALGADO, P., Freire, J.P.B., Mourato, M., Cabral, F., Toullec, R., Lallès, J.P., 2002. *Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes*. *Livestock Production Science*, 74:191-202.
- SAS, 1991. *SAS Systems for Linear Models, 3th ed.* SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SPANGHERO, M., Robinson, P.H., Zanfi, C., Fabbro, E., 2009. *Effect of increasing doses of microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows*. *Animal Feed Science and Technology*, 153:153-157.
- THALER, R.C., Rops, B.D., Christopherson, B.T., 2004. *Efficacy of SUPROL as a growth promotant for grow-finish pigs*. *Journal of Animal Science*, 82:99 (suppl. 1).
- UTIYAMA, C.E., 2004. *Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extractos vegetais como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados*. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 81p.
- VAN SOEST, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. *Carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle*. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.

WALSH, M.C., Sholly, D.M., Hinson, R.B., Trapp, S.A., Sutton, A.L., Radcliffe, J.S., Smith II, J.W., Richert, B.T., 2007 (a). *Effects of acid LAC and Kem-Gest acid blends on growth performance and microbial shedding in weanling pigs*. Journal of Animal Science, 85:459-467.

WALSH, M.C., Sholly, D.M., Hinson, R.B., Saddoris, K.L., Sutton, A.L., Radcliffe, J.S., Odgaard, R., Murphy, J., Richert, B.T., 2007 (b). *Effects of water and diet acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding*. Journal of Animal Science, 85:1799-1808.

WINDISCH, W., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A., 2008. *Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry*. Journal of Animal Science, 86:E140-E148.

Yan, L., Wang, J.P., Kim, H.J., Meng, Q.W., Ao, X., Hong, S.M., Kim, I.H., 2010. *Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower-finisher pigs*. Livestock Science, 128:115-122.