



UTILIZAÇÃO DE DOIS TEORES DE BUTIRATO NO REGIME DE DESMAME DO LEITÃO

Crescimento, Digestibilidade, Fisiologia Digestiva

Sandra Cristina Fernandes Moraes

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

Orientador: Doutor João Pedro Bengala Freire

Co-orientador: Doutor Mário António Silva 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 Silva 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, 2009

Resumo e Palavras-Chave

Foram utilizados 24 leitões com 21 dias de idade para testar o efeito de dois teores de uma fonte de butirato protegido nos parâmetros zootécnicos, digestibilidade, desenvolvimento do tracto gastrointestinal, morfologia da mucosa intestinal e fermentação intestinal. Os leitões foram distribuídos por três regimes: RC (controlo), B:0,25 (regime de base +0,25 % de butirato) e B:0,50 (regime de base +0,50 % de butirato), sendo que a fórmula química de butirato usada doseia 54 % de ácido butírico.

O índice de conversão foi 1,58; 1,71 e 2,40 para os regimes RC, B:0,25 e B:0,50, respectivamente ($P=0,0007$). A utilização de butirato aumentou a digestibilidade da fracção ADF ($P=0,0165$), e o regime B:0,25 aumentou a retenção azotada. Não houve alterações no desenvolvimento do tracto intestinal nem na morfologia da mucosa intestinal (duodeno, jejuno, íleo). Os regimes B:0,25 e B:0,50 conduziram a uma menor produção de AGV no íleo, mas a uma maior produção no ceco.

Palavras-chave: leitões, butirato, digestibilidade, desenvolvimento intestinal, morfologia mucosa intestinal, fermentação intestinal.

Abstract and Key Words

Twenty four piglets 21 days old (6.55 ± 0.43 kg body weight) were used to test the effects of two levels of an encapsulated butyrate source on growth performances, digestibility, gastrointestinal tract development, intestinal mucosa morphology and intestinal fermentation. The piglets were assigned into three diets: RC (control), B:0.25 (base diet +0.25 % butyrate) and B:0.50 (base diet +0.50 % butyrate), attending to the fact that the used butyrate will provide 54 % butyric acid.

The feed conversion ratio was significantly ($P=0.0007$) higher with the diet B:0.50. The use of butyrate increased the digestibility of acid-detergent fibre fraction ($P=0.0165$), and the B:0.25 diet increased the nitrogen retention. Changes were neither verified in the intestinal tract development nor in the intestinal mucosa morphology in any of the analysed segments. Diets B:0.25 and B:0.50 led to a lower volatile fatty acids production in the ileum but an increase was observed in de cecum.

Key words: piglets, butyrate, digestibility, intestinal development, intestinal mucosa morphology, intestinal fermentation.

Extended Abstract

One of the most problematic periods in the pig life is the weaning because of their young age and also nutritional, environmental and social changes. According to Barnett *et al.*, (1989) cit in Piva *et al.* (2002), these stress factors lead to a low feed intake, causing a lower average daily gain and intestinal problems. In the past this problem was solved with the widespread use of antibiotics in subtherapeutic doses which significantly improved piglet performances through the decrease of the detrimental effects of microbiota (Visek, 1978, quoted by Manzanilla *et al.*, 2005). However, their extensive use led to the appearance of resistances in pig intestinal pathogens that might transmit that resistance to human pathogens. This issue caused the total ban of antibiotics as growth promoters in the European Union since January of 2006. Thus safe alternatives have to be found. Among these, organic acids such as citric, formic, fumaric, lactic or propionic appear. These acids help to overcome problems in the post-weaning period when included to the piglet diet (Falkowski and Aherne, 1984; Partanen and Mroz, 1999, quoted by Piva *et al.*, 2002). According to Piva *et al.* (2002), sodium butyrate has shown a positive effect on the improvement of piglet performances. This experiment was conducted to study the effects of two different levels of a complex butyrate source in a weaning diet for piglets.

Twenty four piglets 21 days old (6.55 ± 0.43 kg body weight) were used to test the effects of two levels of butyrate over growth performances, gastrointestinal tract development, intestinal mucosa morphology, dry matter and pH of intestinal contents, digestibility and intestinal microbial fermentation. The piglets were assigned into three diets: RC (control), B:0.25 (base diet +0.25 % butyrate) and B:0.50 (base diet +0.50 % butyrate), attending to the fact that the used butyrate will provide 54 % butyric acid.

After 5 weeks 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 volatile fatty acids were determined in the contents of ileum, cecum and colon by Jouany (1982) method. The bacterial enzymatic activity was determined in the cecum and colon contents by Jehl *et al.* (1996) method.

No significant differences in the final body weight were registered among dietary treatments, but the piglets of the RC diet showed a quantitative greater final body weight (RC = 25.53 kg, B:0.25 = 24.96 kg e B:0.50 = 22.73 kg). The intake of butyrate was neither significantly effective in the average daily feed intake, nor in the average daily gain. But higher the inclusion of butyrate in the diet, lower the feed efficiency: the piglets on the B:0.50 diet significantly needed more food than the others to increase 1 kg of body weight.

Statistically the experimental diets didn't affect the dry matter digestibility. Only the effect of butyrate in the neutral detergent fiber fraction digestibility is worth mentioning, having the B:0.25 diet the best results. Nitrogen retention increased significantly in B:0.25 diet and decreased in B:0.50 diet.

Piglets in B:0.50 treatment presented a significantly greater full stomach and small intestine weight. This can be caused by a slower passage of gastrointestinal contents. Gut weight and length weren't significantly affected by sodium butyrate.

The use of butyrate didn't show significant effects in the intestinal mucosa morphology (duodenum, ileum, jejunum). The data also shows that the use of sodium butyrate tended to low the stomach pH, but didn't affect pH in the intestines. With these results it is possible to assume that sodium butyrate was mainly dissociated or absorbed in the stomach, neither reaching nor affecting the intestines as a whole.

Enzymatic activity of Xylanase, Pectinase and Celulase in cecum and colon was detected but without any differences among treatments. A low production of volatile fatty acids in ileum was verified, but higher production of volatile fatty acids was detected in the cecum, especially of butyric acid, owing the increase of butyrate in the diet.

The obtained results don't prove that butyrate is an effective solution for the piglets post-weaning problems.

Índice

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE	i
ABSTRACT AND KEY WORDS	ii
EXTENDED ABSTRACT	iii
ÍNDICE	v
LISTA DE QUADROS E DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. O TRACTO GASTROINTESTINAL DO SUÍNO ADULTO.....	2
2.1.1. <i>Boca</i>	2
2.1.2. <i>Estômago</i>	3
2.1.3. <i>Intestino delgado</i>	3
2.1.4. <i>Intestino grosso</i>	4
2.1.5. <i>Absorção dos nutrientes digeridos</i>	5
2.1.6. <i>Crescimento e desenvolvimento do epitélio intestinal</i>	5
2.1.7. <i>Fisiopatologia da diarreia</i>	6
2.2. O DESMAME DO LEITÃO	7
2.2.1. <i>Digestão no leitão</i>	7
2.2.2. <i>O Desmame</i>	8
2.3. OS ADITIVOS ALIMENTARES NA ALIMENTAÇÃO DOS SUÍNOS	10
2.3.1. <i>Os Acidificantes Orgânicos na Alimentação do Leitão</i>	11
2.4. O BUTIRATO DE SÓDIO	13
2.4.1. <i>Efeito nos Parâmetros Zootécnicos</i>	14
2.4.2. <i>Efeito na Morfologia Intestinal</i>	15
2.4.3. <i>Efeito na Digestibilidade</i>	17
2.4.4. <i>Efeito no pH, na Microflora Intestinal e na Actividade Enzimática Bacteriana</i>	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. ANIMAIS	20
3.2. REGIMES EXPERIMENTAIS	21
3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	22
3.3.1. <i>Preparação dos refugos e das amostras dos regimes alimentares, fezes e urinas</i>	23
3.4. ANÁLISES	24
3.4.1. <i>Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis</i>	24

3.4.2. <i>Determinação da actividade enzimática microbiana</i>	24
3.4.3. <i>Morfologia da mucosa intestinal dos leitões</i>	25
3.4.4. <i>Determinações analíticas a partir dos regimes alimentares, fezes e urinas</i>	25
3.4.5. <i>Medição do pH dos conteúdos do TGI</i>	26
3.5. CÁLCULOS	26
3.5.1. <i>Performances de crescimento</i>	26
3.5.2. <i>Digestibilidade fecal aparente</i>	26
3.5.3. <i>Balanço azotado</i>	27
3.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	27
4. RESULTADOS	28
4.1. PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS	28
4.2. CONTEÚDOS DO TGI: DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA E DO PH	30
4.3. DESENVOLVIMENTO DO TGI DOS LEITÕES	30
4.4. MORFOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL	31
4.5. DIGESTIBILIDADE FECAL APARENTE	32
4.6. BALANÇO AZOTADO	35
4.7. ACTIVIDADE ENZIMÁTICA MICROBIANA	38
4.8. AGV NOS CONTEÚDOS INTESTINAIS	38
5. DISCUSSÃO	42
5.1. PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS	42
5.2. PH INTESTINAL	43
5.3. ACTIVIDADE ENZIMÁTICA MICROBIANA E OS AGV NOS CONTEÚDOS INTESTINAIS	43
5.4. MORFOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL	45
5.5. DESENVOLVIMENTO DO TGI DOS LEITÕES	45
5.6. DIGESTIBILIDADE E BALANÇO AZOTADO	46
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Lista de Quadros e de Figuras

QUADRO 1 - ALGUNS ADITIVOS ALIMENTARES (BASEADO EM McDONALDS ET AL., 2002).	11
QUADRO 2 - EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO SOBRE OS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DOS SUÍNOS.	14
QUADRO 3 - EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO NA MORFOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL DOS SUÍNOS.	16
QUADRO 4 - EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO SOBRE O PH DOS CONTEÚDOS INTESTINAIS DOS SUÍNOS.	18
QUADRO 5 - EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS VOLÁTEIS NOS INTESTINOS DOS SUÍNOS.	19
QUADRO 6- COMPOSIÇÃO ANALÍTICA DOS 3 REGIMES FORNECIDOS: RC (REGIME DE CONTROLO - 0% DE BUTIRATO); B:0,25 (RC+0,25% DE BUTIRATO) E B:0,50 (RC+0,50% DE BUTIRATO).	20
QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS TRÊS REGIMES FORNECIDOS: RC (REGIME DE CONTROLO - 0% DE BUTIRATO); B:0,25 (RC + 0,25% DE BUTIRATO) E B:0,50 (RC + 0,50% DE BUTIRATO).	21
QUADRO 8 - ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA FECAL E RESPECTIVO ESTADO DAS FEZES.	22
QUADRO 9 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME E DO PERÍODO EXPERIMENTAL NAS PERFORMANCES DE CRESCIMENTO E CONSISTÊNCIA FECAL DE LEITÕES ENTRE AS 3 E AS 8 SEMANAS DE IDADE.	29
QUADRO 10 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NA MATÉRIA SECA E NO PH DOS CONTEÚDOS DO TGI.	30
QUADRO 11 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NO PESO (G/KG PESO VIVO) DOS COMPONENTES DO APARELHO DIGESTIVO E DO BAÇO.	31
QUADRO 12 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NA MORFOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL.	32
QUADRO 13 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME E DO PERÍODO EXPERIMENTAL NA DIGESTIBILIDADE FECAL APARENTE DO REGIME.	34
QUADRO 14 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME E DO PERÍODO EXPERIMENTAL NO BALANÇO AZOTADO DOS LEITÕES.	36
QUADRO 15 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME E DO PERÍODO EXPERIMENTAL NA EXCREÇÃO AZOTADA. .	37
QUADRO 16 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA MICROBIANA (MG/ML).	38
QUADRO 17 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NOS AGV DOS CONTEÚDOS ILEAIS.	39
QUADRO 18 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NOS AGV DOS CONTEÚDOS CECAIS.	40
QUADRO 19 - EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO REGIME NOS AGV DOS CONTEÚDOS DO CÓLON.	41
QUADRO 20 - VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DIGERIDA (G/DIA) DA FRACÇÃO FIBROSA DO ALIMENTO.	46
FIGURA 1 - APARELHO DIGESTIVO DO SUÍNO. (ADAPTADO DE McDONALDS ET AL., 2002)	2
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ANATOMIA DA PAREDE DO INTESTINO DELGADO NUM CORTE TRANSVERSAL. (RETIRADO DE HERDT, 1999)	4
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EPITÉLIO DO INTESTINO DELGADO: VILOSIDADES E CRIPTAS INTESTINAIS. (ADAPTADO DE HERDT, 1999).....	6
FIGURA 4 - DIMINUIÇÃO DA ÁREA DE ABSORÇÃO INTESTINAL POR PERDA DE ENTERÓCITOS MADUROS DA EXTREMIDADE DAS VILOSIDADES. (ADAPTADO DE HERDT, 1999).....	7
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE ÁCIDO BUTÍRICO. (RETIRADO DE HERDT, 1999).....	13
FIGURA 6 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO TEMPORAL DO ENSAIO.	20

FIGURA 7 - GAIOLA DE METABOLISMO.....	21
FIGURA 8 - GRÁFICO QUE ILUSTRA A INTERACÇÃO ENTRE O PERÍODO E O REGIME FORNECIDO SOBRE O CUD DA NDF.....	47
FIGURA 9 - GRÁFICO QUE ILUSTRA A INTERACÇÃO ENTRE O PERÍODO E O REGIME FORNECIDO SOBRE O CUD DA ADF.....	47
FIGURA 10 - GRÁFICO QUE ILUSTRA A INTERACÇÃO ENTRE O PERÍODO E O REGIME FORNECIDO SOBRE A RETENÇÃO AZOTADA.....	48

Lista de Abreviaturas

- ADF – Fibra Ácido-Detergente
ADL – Lenhina Ácido-Detergente
AGV – Ácidos Gordos Voláteis
CMV – Complexo Mineral e Vitamínico
CRN – Coeficiente de Retenção Azotada
CUDap – Coeficiente de Utilização Digestiva Aparente
CUPN – Coeficiente de Utilização Prático do Azoto
E. coli – *Escherichia coli*
GMD – Ganho Médio Diário
IC – Índice de Conversão
ID – Ingestão Diária
MS – Matéria Seca
NDF – Fibra Neutro-Detergente
PB – Proteína Bruta
PV – Peso Vivo
B:0,25 – Regime que doseia 0,25 % de butirato
B:0,50 – Regime que doseia 0,50 % de butirato
RC – Regime de Controlo
TGI – Tracto Gastrointestinal

1. Introdução

Os constantes aumentos de exigência económicos e competitivos na produção da carne de suíno que ocorreram ao longo dos últimos trinta anos levaram a encurtar a idade de desmame dos leitões para 3 semanas ou menos. Apesar das melhorias alcançadas na formulação nutricional para leitões e na selecção de ingredientes, o período do pós-desmame continua a ser uma fase crítica na maioria dos sistemas de produção suína. O desmame, independentemente da idade do leitão, apresenta-se como o maior desafio alimentar que o suíno encontra ao longo da sua vida (Odgaard, 2001, citado por Manzanilla *et al.*, 2005). Juntamente com as alterações fisiológicas, ambientais e sociais que ocorrem numa altura em que os sistemas digestivo e imunitário estão ainda imaturos (Nofrarias *et al.*, 2007), este stress leva a menor consumo de alimento, menor ritmo de aumento de peso, e contribui para o aparecimento de doenças gastrointestinais (Barnett *et al.*, 1989, citados por Piva *et al.*, 2002). Até há pouco tempo este problema era contornado com o uso generalizado de antibióticos em doses subterapêuticas que melhoravam de forma significativa as performances dos leitões através da diminuição dos efeitos nocivos da microflora intestinal (Visek, 1978, citado por Piva *et al.*, 2002). Porém, o seu uso recorrente conduziu ao aparecimento de resistências em microrganismos patogénicos intestinais nos suínos, que poderiam transmitir essa resistência a patogénicos humanos. Isto teve como consequência a total proibição dos antibióticos como promotores de crescimento na Comunidade Europeia desde Janeiro de 2006. Tornou-se assim urgente encontrar alternativas seguras. Entre estas substâncias, encontram-se os ácidos orgânicos, tais como o cítrico, fórmico, fumárico, láctico ou propiónico, que quando adicionados a dietas para leitões ajudam a superar problemas no período de pós-desmame (Falkowski e Aherne, 1984, citados por Piva *et al.*, 2002; Partanen e Mroz, 1999). Da mesma forma o fornecimento de ácido butírico na forma de butirato de sódio demonstrou ter um efeito positivo na melhoria das performances dos leitões (Piva *et al.*, 2002).

Neste estudo avaliou-se o efeito da utilização de dois teores de uma fonte complexa de butirato no regime dos leitões ao desmame sobre o crescimento, digestibilidade, desenvolvimento do tracto gastrointestinal, morfologia da mucosa intestinal e actividade fermentativa nos compartimentos intestinais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O Tracto Gastrointestinal do Suíno Adulto

O tubo digestivo pode ser considerado como sendo “o tubo que se estende da boca ao ânus, ancorado por membranas mucosas, e cuja função é a preensão, ingestão, digestão e absorção dos alimentos, e a eliminação dos excedentes sólidos” (McDonalds *et al.*, 2002). As partes que compõem o Tracto Gastrointestinal (TGI) do suíno (Figura 1) são: boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus.

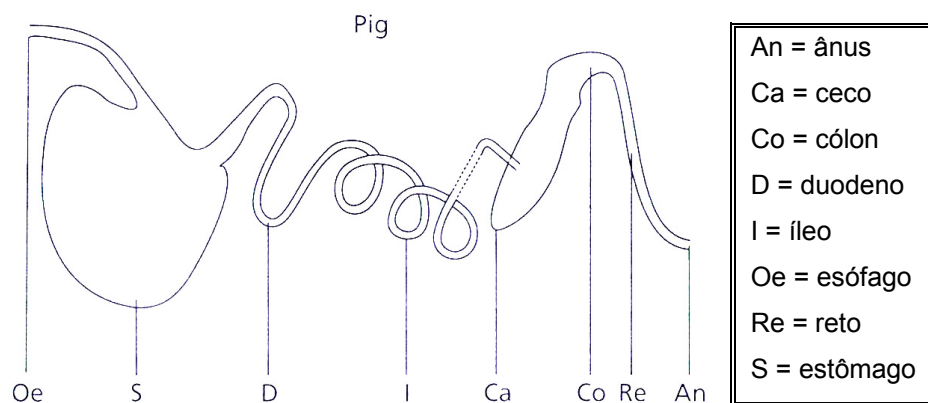


Figura 1 - Aparelho digestivo do suíno. (Adaptado de McDonalds *et al.*, 2002)

A digestão realiza-se ao longo de todo o TGI do suíno, iniciando-se logo na boca e decorrendo ainda ao nível do intestino grosso, porém tem maior incidência no intestino delgado. Os movimentos peristálticos (contrações involuntárias do músculo circular e longitudinal da parede intestinal) têm como funções o transporte de materiais ao longo do TGI, a mistura dos sucos digestivos com o alimento e proporcionar o contacto dos nutrientes digeridos com a membrana da mucosa intestinal para sua absorção. Existem diversas secreções que são escoadas para o interior do TGI, sendo que muitas destas contêm enzimas que hidrolisam vários componentes dos alimentos.

Seguidamente, descreve-se a digestão que ocorre em cada uma das porções do TGI.

2.1.1. Boca

A digestão na boca é maioritariamente mecânica, sendo que a mastigação ajuda a quebrar as partículas dos alimentos e a sua mistura com a saliva, a qual age como lubrificante. A saliva é constituída por cerca de 99 % água, 1 % mucina, sais inorgânicos e enzimas (α -amilase e complexo de lisosimas), e tem um pH 7,3 (ligeiramente acima do valor óptimo e acção da α -amilase). A saliva

tem algumas propriedades anti-bacterianas devido às lisosimas que actuam sobre a parede celular de muitas espécies de bactérias (McDonalds *et al.*, 2002).

2.1.2. Estômago

O estômago do suíno adulto tem uma capacidade de cerca de 8 litros e consiste num simples compartimento que funciona como órgão digestivo e depósito de alimento. A área da sua superfície interior encontra-se aumentada por invaginações do epitélio e divide-se em áreas distintas: área esofágica (é uma extensão do esófago no estômago, a sua superfície não tem glândulas mas uma activa comunidade microbiana, maioritariamente *Lactobacillus* e *Streptococcus*), área do cárdia (segrega um muco viscoso, alcalino e sem enzimas que protege o epitélio de ataques por ácido), região das glândulas gástricas (segrega um muco com glicoproteínas, fucolípidos e pepsinogénio, e contém as células oxínticas que produzem o ácido clorídrico) e região pilórica (com glândulas semelhantes às da região do cárdia). O estômago de um suíno raramente se encontra vazio entre duas refeições e as condições de mistura lenta conduzem a uma fermentação microbiana na porção esofágica e uma digestão gástrica na porção pilórica (McDonalds *et al.*, 2002). O suco gástrico consiste em água, pepsinogénios, sais inorgânicos, mucos, ácido clorídrico e um importante factor intrínseco que promove a eficiente absorção de vitamina B₁₂. A concentração de ácido no suco gástrico varia com a dieta mas é geralmente suficiente para baixar o pH a 2,0. Foram encontradas quatro pepsinas no suíno, com actividade óptima a pH 2,0 e 3,5 e, para além de hidrolisar as proteínas para polipéptidos e alguns aminoácidos, também têm uma forte acção de aglutinação do leite.

2.1.3. Intestino delgado

O alimento parcialmente digerido que sai do estômago entra no intestino delgado, que compreende o duodeno, o jejuno e o íleo, e é o principal local de digestão e absorção. Contém uma série de projecções semelhantes a dedos, as vilosidades intestinais, e a superfície luminal de cada vilosidade encontra-se coberta também ela por pequenas projecções, as microvilosidades, o que aumenta grandemente a área disponível para a absorção de nutrientes (Figura 2). Cada vilosidade contém uma arteríola e uma vénula, juntamente com um tubo de drenagem para o sistema linfático (Herdt, 1999).

Para proteger o intestino delgado do ácido clorídrico que chega do estômago é produzida uma secreção alcalina nas glândulas duodenais ou de Brunner que actua como lubrificante e protege a parede do duodeno. As enzimas segregadas pela mucosa intestinal e pelo pâncreas continuam a digestão iniciada no estômago: a tripsina e as carboxipeptidases (pH óptimo entre 7 e 9) fazem a quebra das proteínas para aminoácidos, os ácidos biliares (segregados pelo fígado) e a lipase pancreática emulsificam e hidrolisam os glóbulos de gordura, a amilase e enzimas específicas (maltase, sacarase, etc) hidrolisam o amido (e polissacáridos relacionados) e os dissacáridos em monossacáridos. Apenas uma pequena porção da hidrólise ocorre no lúmen do intestino (levada a

cabo por enzimas dos enterócitos descamados das vilosidades), ocorrendo a maior parte na superfície luminal das células epiteliais (McDonalds *et al.*, 2002).

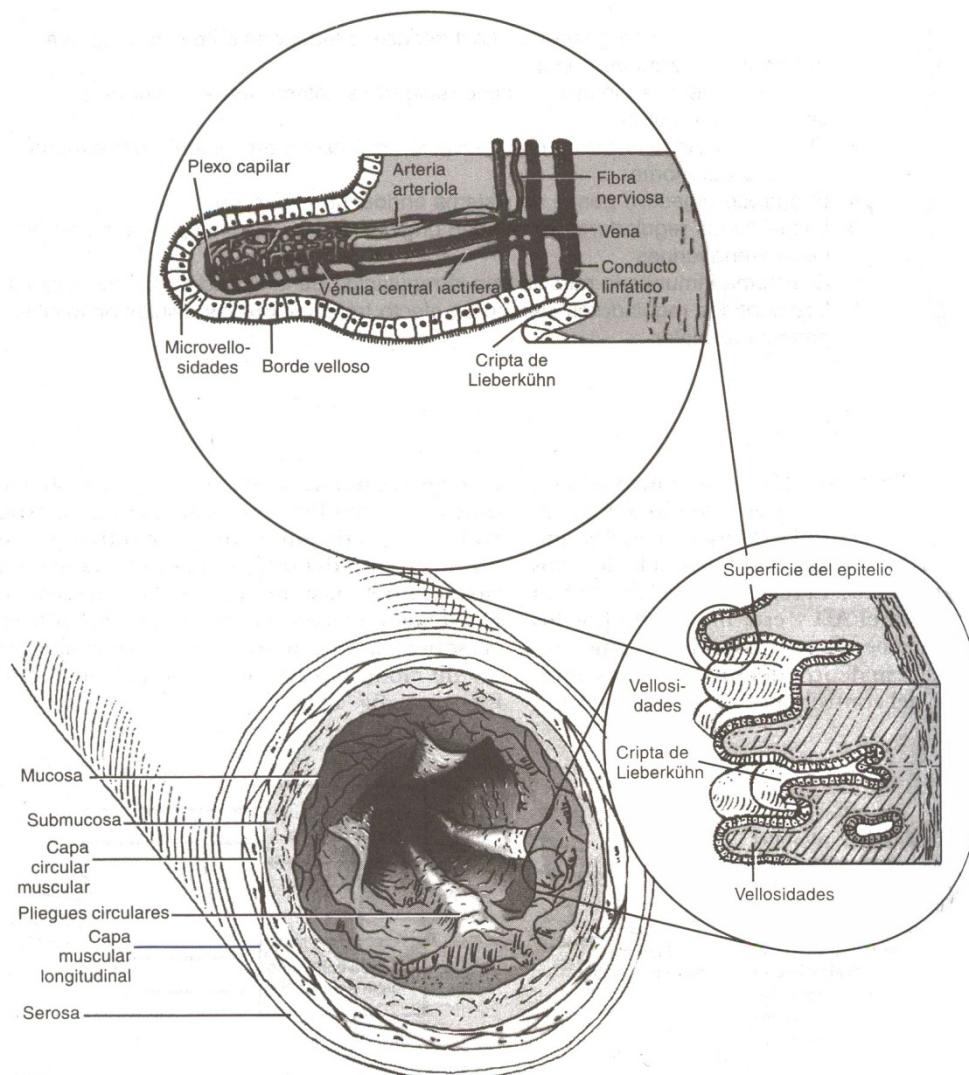


Figura 2 - Representação esquemática da anatomia da parede do intestino delgado num corte transversal. (Retirado de Herdt, 1999)

2.1.4. Intestino grosso

O intestino grosso tem um importante papel na recuperação de nutrientes, água e electrólitos do digesta. A superfície da sua mucosa não apresenta vilosidades, mas apenas pequenas projecções que aumentam a sua área de superfície, e as suas glândulas são maioritariamente glândulas produtoras de muco e não de enzimas. Assim, a digestão no intestino grosso ocorre por acção de enzimas 'arrastadas' com o material alimentar ou resultantes da actividade microbiana.

No intestino grosso, especialmente no ceco, existe uma complexa população de bactérias (incluindo *Lactobacillus*, *Streptococcus*, coliformes, bacteróides, *Clostridia* e leveduras, e que muda em resposta ao material disponível para fermentação) fomentada pela baixa velocidade do trânsito

intestinal e abundância de fontes de nutrientes. Esta microflora metaboliza um largo espectro de fontes de azoto e hidratos de carbono, resultando na formação de vários produtos como, por exemplo, *skatole*, amónia e Ácidos Gordos Voláteis (AGV – ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico). Os AGV são mesmo a maioria dos produtos finais resultantes da actividade microbiana sobre os polissacáridos (Breves, Kock e Schröder, 2007), e sendo absorvidos são uma fonte energética para o hospedeiro. A quantidade de AGV produzida no intestino grosso depende da quantidade e composição do substrato e da microflora presente (van Beers-Schreurs *et al.*, 1998).

2.1.5. Absorção dos nutrientes digeridos

O principal órgão de absorção dos nutrientes da dieta é o intestino delgado, e a absorção de um nutriente a partir do lúmen intestinal pode ocorrer por vários métodos.

Os triglicéridos emulsificados são absorvidos por transporte passivo, que ocorre com uma concentração do nutriente elevada fora da célula e uma baixa no interior. O sistema vascular das vilosidades maximiza este gradiente de concentração.

Os aminoácidos, monossacáridos e pequenos péptidos são absorvidos por transporte activo: a absorção é auxiliada por proteínas transportadoras, que transportam os nutrientes através das membranas da mucosa das células epiteliais recorrendo a iões Na^+ , no caso dos monossacáridos e dos aminoácidos (Herdt, 1999), ou H^+ , no caso dos dipéptidos (McDonalds *et al.*, 2002).

As moléculas grandes, especialmente as imunoglobulinas presentes no colostro, são absorvidas por pinocitose, processo pelo qual as células englobam grandes moléculas em solução/suspensão.

2.1.6. Crescimento e desenvolvimento do epitélio intestinal

Segundo Herdt (1999), o epitélio intestinal (Figura 3) é uma camada contínua, de apenas uma célula de espessura, que cobre as vilosidades e as criptas intestinais.

Os enterócitos das criptas têm uma capacidade altamente mitótica e regeneram-se com rapidez, sendo das células que mais rapidamente se regeneram no corpo. À medida que as células das criptas se multiplicam, migram até à base das vilosidades e vão empurrando as outras células para a extremidade das mesmas. Enquanto migram sofrem uma maturação, de células relativamente indiferenciadas, ao nível das criptas, para células especializadas para a absorção, ao nível das vilosidades. Na extremidade da vilosidade ocorre descamação devido à idade das células e à sua exposição ao conteúdo intestinal (Herdt, 1999).

Assim, o que determina o comprimento das vilosidades é relação entre descamação/substituição. Em média, o tempo de reposição de um enterócito é de 4 a 7 dias, variando com a espécie e estado fisiológico (Herdt, 1999).

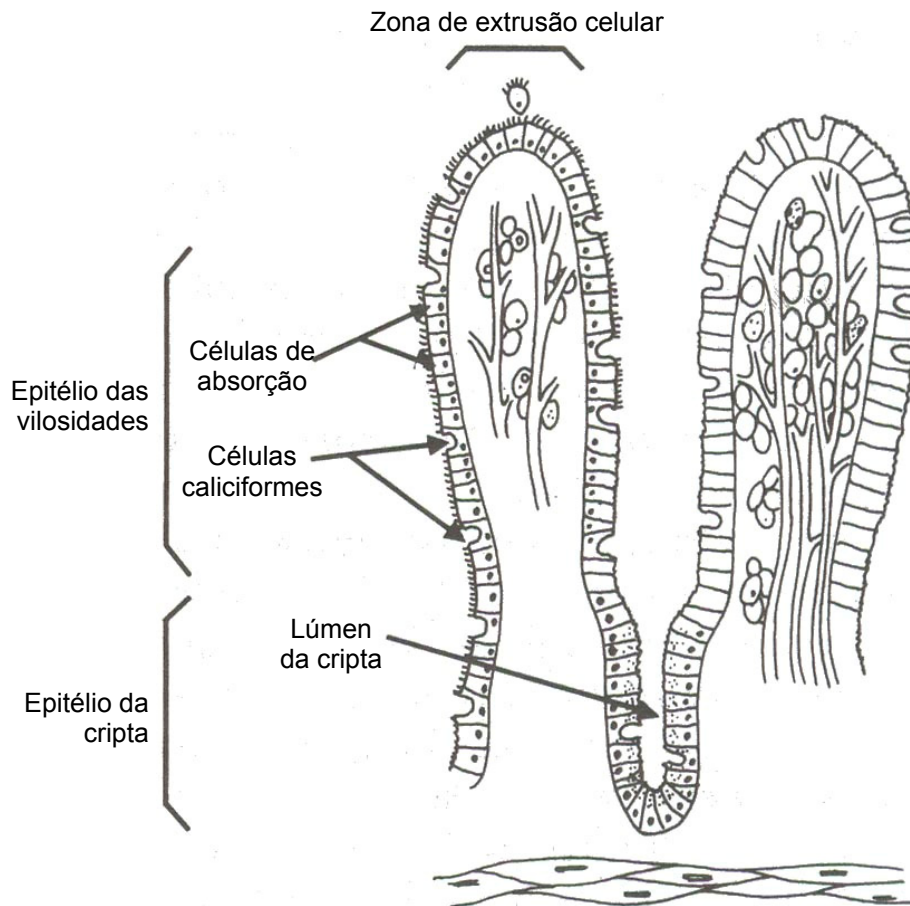


Figura 3 – Representação esquemática do epitélio do intestino delgado: vilosidades e criptas intestinais. (Adaptado de Herdt, 1999)

2.1.7. Fisiopatologia da diarreia

Segundo Herdt (1999), o termo diarreia é referente a um aumento na frequência na defecação ou do volume das fezes (em princípio devido a um aumento no teor em água).

A **diarreia por má absorção** ocorre quando a absorção não recupera uma porção suficiente da água segregada, usualmente devido a uma perda do epitélio do TGI. Na maioria dos casos estas perdas ocorrem devido a infecções que dão lugar a uma diminuição da actividade enzimática intestinal e do comprimento das vilosidades, devido ao aumento da taxa de perda celular em relação à taxa de reposição (Figura 4). As vilosidades mais curtas impedem a absorção por duas razões: existe uma perda de superfície intestinal de absorção, e as células que se perdem são as células maduras que contêm as enzimas para a digestão membranosa e as proteínas de transporte. A perda destas células dá origem a uma diminuição da digestão e da absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, uma diminuição da absorção de água por osmose (Herdt, 1999, Hedemann *et al.*, 2006).

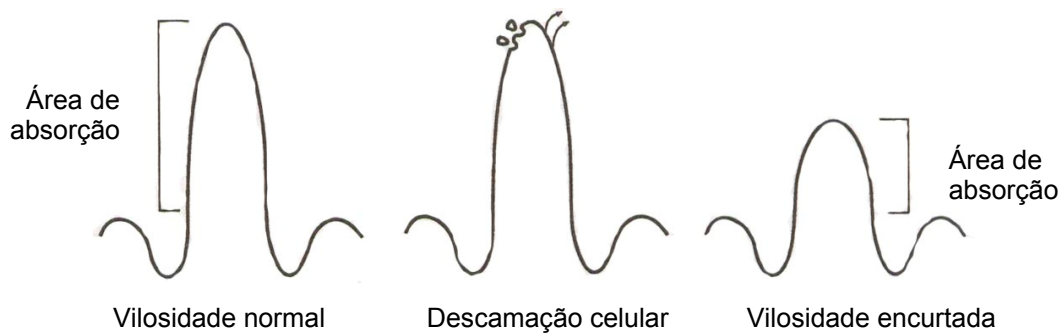


Figura 4 - Diminuição da área de absorção intestinal por perda de enterócitos maduros da extremidade das vilosidades. (Adaptado de Herdt, 1999)

A **diarreia secretora** acontece quando a velocidade da secreção intestinal de água aumenta e ultrapassa a sua capacidade de absorção. A maior parte dos casos de diarreia hipersecretora acontece devido à secreção inapropriada de água resultante de uma estimulação anormal dos mecanismos secretores do epitélio das criptas intestinais. As enterotoxinas produzidas por alguns tipos de bactérias patogênicas conjugam-se com os enterócitos e estimulam a secreção de água e electrólitos pelas células epiteliais das criptas. A diarreia hipersecretora tem efeitos devastadores sobre os electrólitos e o equilíbrio ácido-base dos animais, em especial dos recém-nascidos (Herdt, 1999).

2.2. O Desmame do Leitão

O desmame é provavelmente o período de maior stress na vida de um suíno, devido às muitas mudanças pelas quais tem de passar. Existem diferenças importantes na digestão no leitão e no suíno adulto, pelo que é importante considerar essas especificidades.

2.2.1. Digestão no leitão

Comparando a digestão no leitão e no animal adulto, existem três modificações primárias.

Existe, durante as primeiras horas de vida do jovem leitão, um **epitélio intestinal** especializado, com a mesma estrutura vilosa do epitélio maduro mas com as vilosidades cobertas por enterócitos especiais, capaz de absorver intactas as proteínas solúveis presentes no lúmen intestinal (Herdt, 1999). Esta capacidade diminui rapidamente, sendo já muito reduzida às 24 horas pós-parto (McDonalds *et al.*, 2002), porém é de vital importância para a transferência dos anticorpos do leite materno para o animal recém-nascido, pois não se dá a passagem de anticorpos da mãe para o feto através da placenta.

É pequeno o desenvolvimento da **função pancreática** no animal jovem. Desde o nascimento até à idade de cinco semanas a concentração e a actividade de muitas secreções digestivas no jovem leitão são diferentes das do animal adulto. Sendo a lactose o principal hidrato de carbono na dieta, a actividade da lactase intestinal é elevada ao nascimento e tem o seu máximo na primeira semana de

vida. A actividade da maltase e α -amilase aumenta e a da sacarase atinge um nível constante após as quatro semanas de idade, permitindo que os animais passem da lactose para o amido como fonte de hidratos de carbono (Herdt, 1999, McDonalds *et al.*, 2002).

A **secreção ácida do estômago** é retardada por vários dias após o nascimento, porém a eficiente digestão do alimento nos leitões jovens depende da secreção de ácido no estômago. O estômago apenas produz uma quantidade limitada de ácido clorídrico e pepsinogénio, mas produz quimosina, que faz a quebra parcial e a aglutinação da caseína do leite. O leite coagula no estômago, e a secreção limitada de ácido clorídrico é compensada com a produção de ácido láctico pelos *Lactobacillus* que fermentam a lactose. Isto assegura que o pH desce a níveis que favoreçam a eficiente hidrólise das proteínas e que suprimam as bactérias patogénicas. À medida que o leitão se desenvolve, aumenta a secreção de pepsina e ácido clorídrico.

2.2.2. O Desmame

Considerando as diferenças fisiológicas entre o leitão e o suíno adulto, prevê-se que o desmame seja uma fase difícil para o jovem animal.

De facto, o desmame é um período crítico para os leitões, caracterizando-se por **stress nutricional, fisiológico, ambiental e social**, sendo difícil determinar a contribuição de cada um destes factores (van Beers-Schreurs *et al.*, 1998), e ocorre numa altura em que os sistemas digestivo e imunitário estão ainda imaturos (Nofrarías *et al.*, 2007). No período de desmame, o sistema digestivo dos leitões tem de se adaptar à transição de alimentos líquidos para alimentos sólidos (Wang *et al.*, 2007) e à transição de refeições pequenas e frequentes (libertação de nutrientes para o intestino delgado lenta e constante) para refeições maiores e menos frequentes (McDonalds *et al.*, 2002), desenvolvendo um certo nível de maturidade anatómica e fisiológica em resposta às exigências de uma nova dieta (dieta com amido e proteína de origem vegetal) (Salgado *et al.*, 2002). O intestino delgado do leitão, aquando do desmame, geralmente passa por uma redução do comprimento das vilosidades e um aumento da profundidade das criptas, o que é normalmente associado com uma menor capacidade de absorção. Isto pode levar a má absorção, aumento da fermentação intestinal, diarreia do pós-desmame e redução do consumo de alimento, o que irá diminuir ainda mais o fornecimento de nutrientes (Pluske *et al.*, 1995, citados por Piva *et al.*, 2002), e afectar o ritmo de crescimento. Outro factor predisponente para a ocorrência de diarreias severas e piores índices zootécnicos no pós-desmame é a colonização do intestino delgado por bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotóxicas nos primeiros 5-10 dias após o desmame, ao que se dá o nome de colibacilose pós-desmame (Hampson, 1994, citado por Montagne *et al.*, 2003).

Segundo van Beers-Schreurs *et al.* (1998) e Vente-Spreuwenberg *et al.* (2004), o grau de atrofia das vilosidades está mais intimamente relacionado com o nível ingestão do que com a composição da dieta, e Verdonk *et al.* (2007) adiantam ainda que uma ingestão elevada de leite imediatamente após o desmame previne alterações na arquitectura das vilosidades e mantém a integridade intestinal. Kelly *et al.* (1984) e McCracken e Kelly (1984), citados por van Beers-Schreurs *et al.* (1998), foram os primeiros a reconhecer que uma ingestão inadequada de alimento imediatamente

após o desmame também pode contribuir para as alterações na morfologia intestinal, e Marion *et al.* (2002), citados por Hedemann *et al.* (2006), chegaram mesmo a demonstrar que 56 % da variação do comprimento das vilosidades do intestino delgado proximal era explicada pelo nível de ingestão de alimento.

Os dados obtidos por Verdonk *et al.* (2007) demonstram que um alto nível de ingestão de alimento resultou numa estrutura menos alterada do que um nível mais baixo. Também no mesmo estudo, verificou-se que a arquitectura das vilosidades (comprimento das vilosidades e especialmente a profundidades das criptas), mas não a permeabilidade intestinal, era afectada pelo nível de ingestão de alimento granulado durante os primeiros dias pós-desmame. Tem sido sugerido que a ingestão de alimento seco antes do desmame (*creep feed*) amadurece o TGI e que pode ser um meio de evitar efeitos negativos do desmame, seja por melhorar a morfologia intestinal ou por estimular o consumo de alimento durante o período de pós-desmame (Bruininx *et al.*, 2004, citados por Hedemann *et al.*, 2007). Porém, num estudo realizado por Hedemann *et al.* (2007), observou-se que o *creep feeding* não previne mudanças estruturais no intestino delgado e não teve nenhum efeito na morfologia do intestino grosso, o que os autores atribuíram à grande variabilidade na quantidade consumida.

Têm sido investigados numerosos métodos que permitam diminuir os efeitos nefastos do desmame, desde a escolha dos ingredientes do alimento composto a fornecer, até à junção às dietas de aditivos alimentares. Por exemplo, as dietas fornecidas a leitões desmamados precocemente usualmente incluem uma grande proporção de produtos derivados do leite, contendo **lactose**. Nas dietas para leitões desmamados às 3-4 semanas de idade são também incluídos cereais tratados termicamente, visto o **amido** em bruto ter menor digestibilidade no intestino delgado, passando assim para o intestino grosso onde é fermentado pelas bactérias, causando diarreia (McDonalds *et al.*, 2002).

A **fibra alimentar** é o principal substrato para a fermentação bacteriana no intestino grosso dos animais monogástricos. Como a fibra alimentar interage tanto com a mucosa como com a microflora tem um importante papel no controlo da saúde intestinal (Montagne *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que a inclusão de algumas fontes de fibra alimentar às dietas de desmame podem reduzir a incidência e severidade da colibacilose pós-desmame. Os AGV resultantes da fermentação bacteriana da fibra alimentar podem inibir o desenvolvimento de muitos patogénicos, a maioria dos quais preferem um ambiente neutro ou ligeiramente alcalino para se desenvolverem (Gibson e Wang, 1994, citados por Hedemann *et al.*, 2006). Segundo Bertschinger e Eggenberger (1978), citados por Montagne *et al.* (2003), a presença de polissacáridos não amiláceos solúveis em dietas de desmame influencia negativamente os leitões em termos do seu crescimento e de proliferação de *E. coli* enterotóxica no intestino delgado, mas segundo Bach Knudsen *et al.* (1991), citados por Hedemann *et al.* (2006), pode estimular o crescimento da flora intestinal comensal, levando a uma maior produção de AGV, e a um menor pH no intestino grosso. Também aumenta a viscosidade luminal levando a uma absorção, mais lenta com o risco de diminuir a digestibilidade luminal (Johansen *et al.*, 1997, citados por Hedemann *et al.*, 2006). Por exemplo, num estudo realizado por Hedemann *et al.* (2006), a ingestão de alimento esteve dependente da composição da fibra, sendo que as dietas contendo pectinas tiveram menores ingestões, pois a inclusão de pectinas nas dietas teve como

resultado o aumento da viscosidade luminal e da capacidade de retenção de água, o que pode ter atrasado a passagem do digesta e aumentado a saciedade dos suínos. Por outro lado, os polissacáridos não amiláceos insolúveis podem ajudar a limitar a severidade da colibacilose pós-desmame (Bertschinger e Eggenberger, 1978, citados por Montagne *et al.*, 2003), para além de aumentarem a velocidade do trânsito digestivo, constituem um substrato de degradação lenta para a microflora da parte distal do intestino grosso (Freire *et al.*, 2000, citados por Hedemann *et al.*, 2006). Infelizmente, em leitões saudáveis, níveis elevados de polissacáridos não amiláceos insolúveis têm sido associados a menores aumentos de peso (Kass *et al.*, 1980; Low, 1993, citados por Montagne *et al.*, 2003).

O nível da **Proteína Bruta** (PB) na dieta tem efeitos importantes na saúde e crescimento dos leitões após o desmame (Whang *et al.*, 2003, citados por Lib e Gua, 2004). Por exemplo, num estudo realizado por Lib e Gua (2004), foram testadas cinco dietas contendo 63, 103, 151, 208, ou 249 g/kg dieta de PB, concluindo-se que o tratamento com 208 g/kg resulta numa mucosa do intestino delgado mais intacta e com melhor função digestiva e de absorção, o que é importante para o crescimento do leitão. Porém, quando a PB excede a capacidade digestiva e de absorção do leitão, uma grande quantidade de material azotado não digerido passa do intestino delgado para o cólon, o que leva à ocorrência de fermentação proteica. Isto pode resultar em: menores crescimentos do leitão, diarreia nutricional severa, danos no cólon (Dong *et al.*, 1996, citados por Lib e Gua, 2004) e ser um factor de predisposição para o aparecimento de colibacilose pós-desmame devido à grande capacidade tampão da proteína da dieta no estômago (Prohaszka e Baron, 1980, citados por Bikker *et al.*, 2006). Por outro lado, se o nível de PB na dieta for demasiado baixo, é comprometido o desenvolvimento das vilosidades e do TGI no seu todo (Nunez *et al.*, 1996, citados por Lib e Gua, 2004) e o crescimento do leitão.

Outros ingredientes que possam auxiliar o leitão neste período têm sido estudados. Por exemplo, segundo Bosi *et al.* (2004) e Jiang *et al.* (2000), citados por Nofrarias *et al.* (2007), o plasma desidratado suíno pode manter a integridade da mucosa intestinal (ajudando o leitão a resistir a agressões bacterianas e a melhorar a sua eficiência alimentar) bem como reduzir a resposta pro-inflamatória local dos intestinos, pois, segundo Demas *et al.* (1997) e Pérez-Bosque *et al.* (2004), citados por Nofrarias *et al.* (2007), o grau de activação das células imunitárias pode limitar a disponibilidade de energia alimentar para o crescimento. Por outro lado, Wang *et al.* (2007) defendem que a lactoferrina melhora a morfologia da mucosa intestinal, melhora o rácio bactérias benéficas/patogénicas, diminui a ocorrência de diarreias e melhora a performance de crescimento dos leitões desmamados.

2.3. Os Aditivos Alimentares na Alimentação dos Suínos

“Os aditivos alimentares são compostos que são administrados ao animal para melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes, e actuam ao nível do intestino ou das células da parede intestinal. Existem argumentos teóricos que demonstram que os aditivos devem ser eficazes, porém,

dada a natureza dinâmica da fisiologia do TGI, é frequentemente difícil demonstrar os seus efeitos na prática” - McDonalds *et al.* (2002).

Existem vários tipos de aditivos utilizados na alimentação dos suínos, descrevendo-se alguns deles de forma sucinta no Quadro 1.

Quadro 1 - Alguns aditivos alimentares (baseado em McDonalds *et al.*, 2002).

Aditivo	Modo de acção	Observações
Antibióticos (Compostos químicos produzidos em laboratório ou por microrganismos)	<ul style="list-style-type: none"> • Redução das bactérias produtoras de toxinas e das infecções sub-clínicas; • Estimulação do crescimento de microrganismos que sintetizam compostos não definidos; • Redução da competição por nutrientes entre bactérias e hospedeiro; • Menor espessura da parede intestinal e melhor capacidade de absorção. 	Total proibição dos antibióticos usados como promotores de crescimento na União Europeia desde Janeiro de 2006.
Probióticos (Microrganismos vivos)	<ul style="list-style-type: none"> • Adesão ao TGI e prevenção da colonização por microrganismos patogénicos; • Neutralização de enterotóxicas; • Actividade bactericida (redução do pH, produção de antibióticos, etc.); • Melhoria da competência imunitária por estimulação do sistema imunitário. 	São usadas estirpes de <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Streptococcus</i> em monogástricos.
Prebióticos ou Oligossacáridos (Compostos vegetais e animais que não os nutrientes)	<ul style="list-style-type: none"> • Podem ser fermentados por bactérias favoráveis, alterando assim a população microbiana a favor destes microrganismos; • As bactérias patogénicas ligam-se preferencialmente a eles e não à parede intestinal, sendo arrastados com o conteúdo do intestino. 	Naturalmente presentes nos alimentos: nos legumes e soja os α -galactooligosacáridos (GOS), nos cereais os fructooligosacáridos (FOS), no leite os <i>trans</i> -galactooligosacáridos (TOS), e nas paredes de leveduras os mannanoligosacáridos (MOS).
Enzimas (Enzimas exógenas)	<ul style="list-style-type: none"> • Suplementam as enzimas do animal; • Aumentam a disponibilidade dos polissacáridos e proteínas vegetais; • Quebram factores anti-nutricionais presentes no alimento. 	Usadas essencialmente em suínos e aves.
Ácidos Orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzem o pH do estômago; • Efeitos benéficos na digestão proteica; • Controlam da microflora do TGI; • Efeito anti-microbiano em bolores e bactérias. 	Tem sido difícil obter provas experimentais dos efeitos atribuídos aos ácidos orgânicos.

2.3.1. Os Acidificantes Orgânicos na Alimentação do Leitão

De forma a contornar os problemas causados pelo desmame precoce do leitão, têm vindo a ser adicionados ácidos à alimentação dos leitões para compensar a baixa produção de ácido clorídrico no estômago, promovendo uma descida rápida do pH com efeitos benéficos na digestão das proteínas e

na microflora intestinal. Apesar de os ácidos inorgânicos serem usados para fornecer iões H^+ , e promover a descida do pH, os ácidos orgânicos têm ainda propriedades adicionais desejáveis. Na forma de sal são geralmente inodoros e fáceis de manusear; encontram-se no estado sólido e são menos voláteis; são menos corrosivos e mais facilmente solúveis em água; e os aniões têm um efeito anti-microbiano nos fungos e bactérias dos alimentos, pelo que são adicionados intencionalmente a muitos alimentos como conservantes (Knochel e Gould, 1995; Podolak *et al.*, 1996, citados por Piva *et al.*, 2002, Partanen e Mroz, 1999). Tem-se descrito a capacidade dos aniões para actuarem como agentes complexantes de catiões, tais como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , melhorando a sua retenção (McDonalds *et al.*, 2002). Finalmente, os ácidos orgânicos, uma vez absorvidos pelo suíno, podem ser usados como substratos imediatos no metabolismo intermédio, principalmente como fontes energéticas.

Tem-se revelado difícil obter evidências experimentais de todos estes efeitos atribuídos aos ácidos orgânicos, mas apesar de os modelos de acção dos ácidos não serem claros, a sua adição à dieta dos suínos provou ser benéfica em termos de digestibilidade dos nutrientes, crescimento e Índice de Conversão (IC) (McDonalds *et al.*, 2002).

A maioria dos estudos foi realizada com os **ácidos fórmico, propiónico, láctico, cítrico** ou com os seus respectivos sais. Existe menos informação sobre a utilização de **ácido butírico**, apesar da sua importância como nutriente para o epitélio intestinal (Bach Knudsen *et al.*, 2003, citados por Manzanilla *et al.*, 2006). McDonalds *et al.* (2002) afirmam que os ácidos fórmico e propiónico são mais eficientes que os ácidos fumárico ou cítrico para o mesmo nível de inclusão, pois têm um peso molecular mais baixo. Já Gálfi e Bokori (1990) indicam que o butirato de sódio exerce o seu efeito favorável em concentrações 3,6 a 24,2 vezes menores do que outros ácidos orgânicos (cítrico, fumárico ou propiónico). Num estudo realizado por Biagi *et al.* (2006), verificou-se que a administração de **ácido glucónico** tendeu a melhorar a performance de crescimento dos leitões na fase do pós-desmame, influenciou a actividade da microflora intestinal e aumentou a concentração de AGV nos intestinos. O **ácido glucónico** é fracamente absorvido no intestino delgado; atingindo assim o intestino grosso (Asano *et al.*, 1997, citado por Biagi *et al.*, 2006), onde é fermentado pela microflora local dando origem essencialmente a ácido butírico (Tsukahara *et al.*, 2002, citado por Biagi *et al.*, 2006).

Os AGV desempenham um papel chave como fonte energética, sendo o **ácido butírico** o mais rapidamente oxidado para CO_2 de entre todos os AGV no intestino (Fleming e Gill, 1997, citados por Piva *et al.*, 2002). Os AGV são usados pelo corpo de maneiras diversas, tendo papéis específicos. O **ácido acético** é transportado para o fígado, aí funcionando como substrato energético para o tecido muscular. O **ácido propiónico** é convertido em glucose no fígado. O **ácido butírico** é usado primeiramente pelos enterócitos do cólon, sendo uma boa fonte energética para as suas actividades metabólicas. Os AGV contribuem assim com uma quantidade substancial de energia para o intestino e para todo o organismo dos animais monogástricos (Argenzio e Southworth, 1974, citados por Montagne *et al.*, 2003), chegando mesmo a estimar-se que cerca de 60 a 70 % do fornecimento da energia para o epitélio normal do cólon deriva dos AGV, em especial o ácido butírico (Scheppach *et al.*, 1992, citado por Piva *et al.*, 2002). Os AGV também estimulam a reabsorção de água e

electrólitos (em particular do sódio) no intestino grosso (Argenzio e Whipp 1979, Roediger e Moore, 1981, citados por van Beers-Schreurs *et al.*, 1998), limitando assim o risco de diarreia e, quando num ambiente ácido, são capazes de inibir o crescimento de algumas bactérias patogénicas intestinais como *E. coli* e *Clostridium difficile* em suínos (Prohaska, 1986; May *et al.*, 1994, citados por Montagne *et al.*, 2003). Também têm como acção a estimulação da proliferação das células do epitélio resultando numa maior área de absorção (Sakata, 1988, citado por Piva *et al.*, 2002).

Os ácidos orgânicos não têm o seu uso restringido à administração directa aos animais através da sua inclusão no alimento composto. Existem vários estudos em que a sua acção no TGI dos suínos é conseguida através do fornecimento de materiais que fomentam a sua produção no intestino grosso dos animais. O tipo e nível dos hidratos de carbono não digestíveis disponíveis para fermentação são os principais factores de controlo da produção e composição dos AGV no intestino grosso dos suínos em crescimento (Bauer *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004, citados por Lærke *et al.*, 2007). No entanto as fibras alimentares dificilmente hidrolisáveis não são o único produto passível de influenciar a produção de AGV. Num estudo realizado por Bikker *et al.* (2006), a formação de ácido butírico no cólon pode ter sido directamente estimulada pela presença de amido resistente na dieta, mas também pela estimulação das bactérias produtoras de ácido láctico presentes nos intestinos. Isto está de acordo com Tsukahara *et al.* (2002), citados por Bikker *et al.* (2006), que sugeriram uma relação indirecta entre as bactérias produtoras de ácido láctico e o ácido butírico, isto é, com elevadas contagens de bactérias produtoras de ácido láctico, mais ácido láctico é produzido e convertido em ácido butírico pelas bactérias utilizadoras de ácidos presentes no lúmen intestinal.

Sendo o ácido butírico, sob a forma de sal, o ácido orgânico utilizado neste trabalho, será objecto de um estudo mais aprofundado no próximo capítulo.

2.4. O Butirato de Sódio

O ácido butírico (Figura 5) é um ácido fraco e um dos principais produtos finais da fermentação dos hidratos de carbono pelas bactérias anaeróbias do rúmen das espécies animais ruminantes, e do cólon das espécies omnívoras (Kotunia *et al.*, 2004). O ácido butírico demonstrou induzir a diferenciação celular e regular o crescimento e a proliferação de mucosa normal no cólon e no íleo (Treem *et al.*, 1994, citados por Piva *et al.*, 2002), ao mesmo tempo que suprime o crescimento de células cancerígenas (Clausen *et al.*, 1991 citados por Piva *et al.*, 2002).

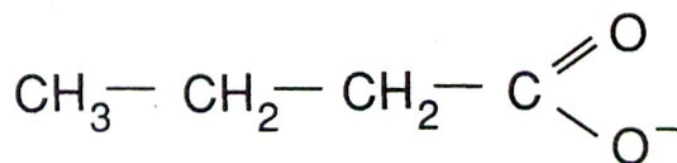


Figura 5 – Representação da molécula de ácido butírico. (Retirado de Herdt, 1999)

Nos ensaios experimentais, o butirato de sódio é frequentemente utilizado em substituição do ácido butírico pois apresenta-se na forma sólida, é estável, é menos volátil e produz muito menos

odor. Os efeitos do butirato de sódio são devidos a acções biológicas generalistas das moléculas em vez de ser devido ao seu carácter acidificante (Kotunia *et al.*, 2004).

2.4.1. Efeito nos Parâmetros Zootécnicos

Ao pesquisar na bibliografia acerca dos efeitos nos diferentes parâmetros zootécnicos do uso de butirato de sódio em dietas para suínos, os dados encontrados apontam em direcções bastante díspares (Quadro 2), não indicando inequivocamente um efeito benéfico do seu uso.

Quadro 2 - Efeito do butirato de sódio sobre os parâmetros de crescimento dos suínos.

Referência	Animais	Duração ⁽¹⁾	Butirato ⁽²⁾	PV final	GMD	Ingestão	IC
Gálfi e Bokori (1990)	7 kg PV inicial	n.d.	1700 ppm	n.d.	↑	↑	↑
Piva <i>et al.</i> (2002)	9,2±1,4 kg PV inicial	0-14 dias	800 ppm	↑	↑	↑	↔
		15-35 dias	800 ppm	↔	↔	↑	↑
		36-56 dias	800 ppm	↔	↔	↔	↔
		0-52 dias	800 ppm	↔	↔	↔	↑
Kotunia <i>et al.</i> (2004)	1,94±0,2 kg PV inicial	7 dias	3000ppm	↑	↑	n.d.	n.d.
Biagi <i>et al.</i> (2007)	6,68±0,13 kg PV inicial	6 semanas	1000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↔
			2000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↔
			4000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↔
Weber e Kerr (2008)	6,3 kg PV inicial	28 dias	500 ppm	n.d.	↔	↔	↔
			1000 ppm	n.d.	↔	↔	↔
			2000 ppm	n.d.	↔	↔	↔
			4000 ppm	n.d.	↔	↔	↔
Tonel (2009)	6,94±0,7 kg PV inicial	5 semanas	5000 ppm a 54 % 2500 ppm a 98 %	↔	↔	↔	↔
Manzanilla <i>et al.</i> (2006)	6,0±0,1 kg PV inicial	0-7 dias	3000 ppm	n.d.	↔	↔	↔
		7-14 dias	3000 ppm	n.d.	↔	↔	↑
		0-14 dias	3000 ppm	n.d.	↔	↔	↑

Legenda: ↑ - Aumentou significativamente;

↓ - Diminuiu significativamente;

↔ - Alteração não significativa;

n.d. – Dados não disponíveis.

PV - Peso Vivo (kg)

⁽¹⁾ Duração dos ensaios.

⁽²⁾ Teor de inclusão nos regimes.

Por exemplo, Gálfi e Bokori (1990) foram os primeiros a demonstrar uma influência positiva do butirato de sódio no aumento do Peso Vivo (PV), do Ganho Médio Diário (GMD) (+23,5 %) e da ingestão diária de alimento (+8,9 %), obtendo melhorias produtivas nas baterias de recria e engorda de leitões. Porém, Piva *et al.* (2002), utilizando leitões alimentados com uma dieta base acidificada (contendo 0,5 g de ácido fórmico e 1,5 g de ácido láctico por kg de alimento) à qual se adicionou

butirato de sódio a 0,8 g/kg, verificaram que, na generalidade, o uso de butirato de sódio apenas influenciou significativamente a eficiência alimentar, piorando-a, sendo o período dos 0 aos 14 dias o único em que os dados recolhidos revelam uma eficiência positiva sobre os parâmetros zootécnicos (+20 % GMD e +16 % ingestão). Já Weber e Kerr, (2008) apenas detectaram uma tendência linear de decréscimo dos níveis de ingestão e GMD com o aumento dos níveis de butirato de sódio, mas nenhuma influência significativa, pelo que concluíram que a inclusão de butirato de sódio na dieta não melhorou a performance de crescimento.

Segundo Piva *et al.* (2002), apenas se encontram efeitos positivos num período imediatamente após o desmame visto haver nesta fase uma resposta efectiva da arquitectura intestinal ao butirato de sódio. Porém Biagi *et al.* (2007) defendem que a incoerência dos efeitos do butirato de sódio no crescimento de suínos pode ser atribuída a diferentes composições da dieta base e diferentes estados de maturação intestinal, o que determina a extensão do efeito do butirato de sódio.

2.4.2. Efeito na Morfologia Intestinal

Segundo Sakata e Setoyama (1997), citados por Piva *et al.* (2002), o peso do intestino delgado e grosso aumenta três vezes mais depressa do que o total da massa corporal durante o período do desmame, pelo que é extremamente interessante a melhoria da performance de crescimento que pode estar associada com o efeito benéfico do butirato na proliferação do epitélio intestinal. Os dados recolhidos por Hodin *et al.* (1997), citados por Tonel (2009), e também os recolhidos por Piva *et al.* (2002), indicam que a eficácia do butirato de sódio é maior no período imediatamente após o desmame em virtude das vilosidades intestinais se encontrarem atrofiadas.

Porém, verifica-se na bibliografia consultada que a adição de butirato de sódio às dietas para suínos não tem efeitos significativos quer na morfologia da mucosa intestinal, quer no desenvolvimento do TGI, exceptuando-se um ou outro caso pontual (Quadro 3).

Uma explicação para a ausência de efeitos do butirato de sódio na morfologia intestinal pode ser dada pelo aumento da sua concentração no estômago mas não nos intestinos consecutivo à sua ingestão pelos suínos (Gálfi e Bokori, 1990, Manzanilla *et al.*, 2006, Biagi *et al.*, 2007). Tal pode dever-se à metabolização muito rápida do butirato de sódio, à conversão do butirato para substâncias como o acetato ou à absorção do butirato na parte esofágica do estômago. Biagi *et al.* (2007) dão ainda como razão para a ausência de maiores efeitos do butirato de sódio na morfologia intestinal o facto de as amostras de mucosa intestinal serem colhidas no final do ensaio, 6 semanas após o desmame, logo em leitões com um TGI quase totalmente desenvolvido.

Quadro 3 - Efeito do butirato de sódio na morfologia da mucosa intestinal dos suínos.

Referência	Animais	Duração ⁽¹⁾	Butirato ⁽²⁾	Altura vilosidades				Largura vilosidades				Profundidade criptas					Comp. Int.		
				Duo.	Jej.	Íleo	Ceco	Duo.	Jej.	Íleo	Ceco	Duo.	Jej.	Íleo	Ceco	Cólon	Delg.	Gro.	
Gálfi e Bokori (1990)	7 kg PV inicial	n.d.	1700 ppm	n.d.	n.d.	↑	↔	n.d.	n.d.	↔	↔	n.d.	n.d.	↔	↑	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kotunia <i>et al.</i> (2004)	1,94±0,2 kg PV inicial	7 dias	3000 ppm	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	↔	n.d.	
Manzanilla <i>et al.</i> (2006)	6,0±0,10 kg PV inicial	14 dias	3000ppm	n.d.	↔	↔	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	↑	↔	n.d.	↔	n.d.	n.d.	
Biagi <i>et al.</i> (2007)	6,68±0,13 kg PV inicial	6 semanas	1000 ppm (a 85 %)	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			2000 ppm (a 85 %)	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			4000 ppm (a 85 %)	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tonel (2009)	6,94±0,70 kg PV inicial	5 semanas	5000 ppm (a 54 %)	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	↔	↔	
			2500 ppm (a 98 %)	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	n.d.	↔	↔	

Legenda: ↑ - Aumentou significativamente;

↓ - Diminuiu significativamente;

↔ - Alteração não significativa;

n.d. – Dados não disponíveis.

PV – Peso Vivo (kg)

⁽¹⁾ Duração do ensaio.

⁽²⁾ Teor de inclusão no regime.

2.4.3. Efeito na Digestibilidade

É muito escassa a bibliografia disponível sobre a forma como o butirato de sódio actua sobre a digestibilidade. Uma forma possível seria por estímulo da função pancreática, pois, segundo Herdt (1999), a produção de colecistoquinina que controla parte da actividade pancreática é estimulada pela presença de ácidos gordos no duodeno. Outra possibilidade seria a melhoria das condições de fermentação microbiana e uma conseqüente diminuição da produção de material endógeno, o que melhora a eficiência de utilização dos alimentos. Uma terceira hipótese seria um abaixamento do pH gástrico, o que permitiria melhores condições de actividade enzimática no estômago, porém, segundo Ichikawa *et al.* (2002) citados por Tonel (2009), o ácido butírico é um ácido fraco e sendo ingerido em pequenas doses o seu efeito no pH gástrico pode ser diminuto.

Segundo dados do ensaio de Manzanilla *et al.* (2006), o tratamento com butirato de sódio provocou uma menor digestibilidade da MS e do amido em todo o TGI apesar de uma melhoria na eficiência alimentar, o que conduziu a uma menor concentração de AGV no cólon. Dado a melhor eficiência produtiva dos animais alimentados com a dieta contendo butirato de sódio, os autores sugerem que o butirato de sódio pode ter melhorado as condições de saúde dos animais e a eficiência de utilização dos nutrientes para o crescimento. Já no estudo levado a cabo por Tonel (2009) a digestibilidade aparente da MS não foi significativamente afectada pelo regime, mas houve um aumento da digestibilidade das fracções PB e NDF.

2.4.4. Efeito no pH, na Microflora Intestinal e na Actividade Enzimática Bacteriana

Ao consultar a bibliografia sobre o tema, constata-se que os efeitos do uso do butirato de sódio no pH dos conteúdos do TGI são quase inexistentes (Quadro 4). Segundo Biagi *et al.* (2007), visto os ácidos orgânicos poderem atravessar as membranas e serem facilmente absorvidos, é difícil chegarem ao intestino grosso se não estiverem microencapsulados, o que torna um efeito directo do butirato de sódio no pH intestinal improvável. Já Ichikawa *et al.* (2002), citados por Tonel (2009), defendem que o butirato de sódio (ácido fraco) ingerido em pequenas doses, juntamente com um baixo pH gástrico, é parcialmente absorvido no estômago tendo portanto um efeito limitado ou residual na redução do pH nos conteúdos dos compartimentos do TGI.

Quadro 4 - Efeito do butirato de sódio sobre o pH dos conteúdos intestinais dos suínos.

Referência	Animais	Duração ⁽¹⁾	Butirato ⁽²⁾	Estômago	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon
Manzanilla <i>et al.</i> (2006)	6,0±0,10 kg PV inicial	14 dias	3000 ppm	↔	n.d.	↔	↔	↔
Biagi <i>et al.</i> (2007)	6,68±0,13 kg PV inicial	6 semanas	1000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↑	n.d.
			2000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↑	n.d.
			4000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↑	n.d.
Tonel (2009)	6,94±0,70 kg PV inicial	5 semanas	5000 ppm (a 54 %)	↔	n.d.	↔	↔	↔
			2500 ppm (a 98 %)	↔	n.d.	↔	↔	↔

Legenda: ↑ - Aumentou significativamente;
 ↓ - Diminuiu significativamente;
 ↔ - Alteração não significativa;
 n.d. – Dados não disponíveis.
 PV – Peso Vivo (kg)
⁽¹⁾ Duração do ensaio.
⁽²⁾ Teor de inclusão no regime.

Relativamente à microflora intestinal, aquando do seu ensaio com 1700 ppm de butirato de sódio na dieta experimental, Gálfi e Bokori (1990) demonstraram uma influência positiva do butirato de sódio na composição da microflora do jejuno em suínos em crescimento: diminuiu a contagem de coliformes e aumentou a contagem de *Lactobacillus* spp. Num estudo posterior, realizado por Castillo *et al.* (2006) com leitões alimentados com uma dieta de controlo sem aditivos, ou com 0,04 % de antibiótico, 0,3 % de butirato de sódio ou 0,03 % de extractos de plantas, verificaram que o tratamento com butirato de sódio foi o que promoveu maiores alterações no ecossistema microbiano, não através da redução da população microbiana mas promovendo a selecção de bactérias específicas, o que os autores justificam com a existência de muitos factores tais como a activação ou inibição de diferentes vias metabólicas. Já no ensaio desenvolvido por Biagi *et al.* (2007), as contagens bacterianas no jejuno, íleo e ceco não foram afectadas pela suplementação com butirato de sódio nos leitões sacrificados às 10 semanas de idade.

Ao consultar a bibliografia, verifica-se que a actividade enzimática bacteriana, e a produção de AGV (Quadro 5), parecem ser os parâmetros mais influenciados pelo uso de butirato de sódio. No ensaio realizado por Castillo *et al.* (2006) não foi detectada qualquer actividade de celulase ou xilanase, mas foram encontradas consideráveis actividades de amilase e amilopectinase, todavia sem diferença entre dietas. Segundo os autores, esta falha de actividade enzimática bacteriana pode estar relacionada com uma adaptação insuficiente do microbiota à complexa digestão dos hidratos de carbono tais como a celulose ou a hemicelulose nos animais jovens. Já Tonel (2009) verificou que, devido a uma maior digestibilidade das dietas com o uso de butirato de sódio, houve uma diminuição da actividade das enzimas microbianas (Xilanase, Pectinase e Celulase) no ceco e no cólon.

Quadro 5 - Efeito do butirato de sódio sobre a produção de Ácidos Gordos Voláteis nos intestinos dos suínos.

Referência	Animais	Duração	Butirato	Jejuno				Íleo				Ceco				Cólon			
				C2	C3	C4	IC4	C2	C3	C4	IC4	C2	C3	C4	IC4	C2	C3	C4	IC4
Manzanilla <i>et al.</i> (2006)	6,0±0,10 kg PV inicial	14 dias	3000 ppm	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↔	↔	↔	n.d.
Biagi <i>et al.</i> (2007)	6,68±0,13 kg PV inicial	6 semanas	1000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↔	↑	↑	↑	↑	↔	↔	↔	↓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			2000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↔	↓	↑	↓	↑	↔	↔	↔	↑	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			4000 ppm (a 85 %)	↔	↔	↔	↔	↑	↑	↑	↑	↔	↔	↔	↑	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tonel (2009)	6,94±0,70 kg PV inicial	5 semanas	5000 ppm (a 54 %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↓	↓	↔	n.d.	↓	↓	↔	n.d.
			2500 ppm (a 98 %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	↔	↔	↔	n.d.	↓	↔	↔	n.d.	↓	↓	↓	n.d.

C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico.

Legenda: ↑ - Aumentou significativamente;

↓ - Diminuiu significativamente;

↔ - Alteração não significativa;

n.d. – Dados não disponíveis.

PV – Peso Vivo (kg)

⁽¹⁾ Duração do ensaio.

⁽²⁾ Teor de inclusão no regime.

3. Materiais e Métodos

O ensaio realizado teve como objectivo o estudo do uso de dois níveis (0,25 % e 0,50 %) de uma nova fórmula de butirato no regime alimentar dos leitões no período do pós-desmame.

O ensaio foi realizado em duas fases: a fase experimental decorreu com os animais num pavilhão da Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia, a analítica decorreu no Laboratório Pais de Azevedo e na Faculdade de Medicina Veterinária.

3.1. Animais

Neste ensaio foram utilizados 24 leitões (machos), resultantes do cruzamento Duroc x Landrace (F1). O ensaio durou 5 semanas, tendo decorrido previamente um período de 3 dias de adaptação (Figura 6).

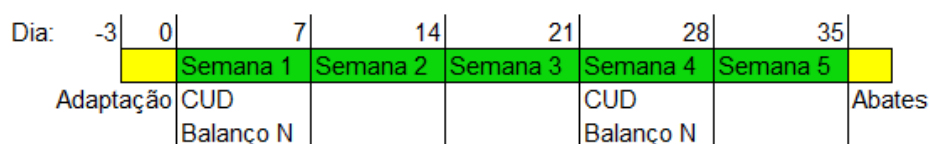


Figura 6 - Esquema da organização temporal do ensaio.

Os leitões iniciaram o ensaio com cerca de 3 semanas de idade e com um PV médio de 6,55 kg ($\pm 0,43$ kg). Os animais foram divididos por 3 lotes, constituído cada um por 8 leitões distribuídos de forma homogénea em função do PV. Cada lote de animais foi alimentado com um dos 3 regimes experimentais, encontrando-se os seus constituintes (g/kg) e composição química (%) nos quadros 6 e 7, respectivamente.

Quadro 6- Composição analítica dos 3 regimes fornecidos: RC (Regime de Controlo – 0 % de butirato); B:0,25 (RC+0,25 % de butirato) e B:0,50 (RC+0,50 % de butirato).

Ingredientes (%)	RC	B:0,25	B:0,50
Trigo	66,10	65,85	65,60
Bagaço de Soja (47)	16,00	16,00	16,00
Soro de Leite	5,00	5,00	5,00
Farinha de Peixe (70)	7,00	7,00	7,00
Óleo de Soja	3,00	3,00	3,00
Butirato	0,00	0,25	0,50
L-Lisina	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina	0,20	0,20	0,20
Carbonato de Cálcio	0,70	0,70	0,70
Fosfato Bicálcico	0,90	0,90	0,90
Cloreto de Sódio	0,20	0,20	0,20
CMV ⁽¹⁾	0,50	0,50	0,50

⁽¹⁾ Complexo Mineral e Vitamínico. Composição por kg de alimento: Vitaminas: A: 25000 UI; D₃: 2000 UI; E: 0,120 UI; C: 0,200 UI; K₃: 1 mg; B₁: 1,5 mg; B₂: 5 mg; B₃: 30 mg; B₅: 15 mg; B₆: 2,5 mg; B₉: 0,500 mg; B₁₂: 0,030 mg; H₁₂: 80 mg; Colina: 0,300 g. Minerais (mg): Fe: 120; Cu: 160; Mn: 50; Zn: 140; I: 1; Co: 0 500; Se: 0 300

Quadro 7 - Composição química dos três regimes fornecidos: RC (Regime de Controlo – 0 % de butirato); B:0,25 (RC + 0,25 % de butirato) e B:0,50 (RC + 0,50 % de butirato).

Composição Química (%)	RC	B:0,25	B:0,50
MS	89,80	89,91	89,95
Cinza	5,29	5,44	5,60
PB	19,35	19,16	18,57
NDF	12,35	12,15	11,48
ADF	2,50	2,86	2,41
ADL	0,94	0,91	0,93

Cada animal foi instalado numa gaiola individual de metabolismo (Figura 7), feita em metal com um piso em ripado e equipada inferiormente com um tabuleiro em aço inoxidável perfurado e outro em forma de funil para a separação e recolha das fezes e das urinas. Cada gaiola dispunha de um bebedouro de chupeta e de um comedouro.



Figura 7 - Gaiola de metabolismo.

O controlo da temperatura ambiente era realizado recorrendo a equipamentos de ar condicionado e sendo o ar renovado por ventilação forçada.

3.2. Regimes experimentais

Os regimes alimentares dos leitões foram preparados na fábrica de rações da Secção de Produção Animal do ISA.

Foi utilizada uma nova fórmula de butirato, que doseava 54 % de ácido butírico, e era constituída por uma mistura de sais de sódio, potássio e cálcio e ácidos gordos alimentares que constituem uma matrix de protecção. Esta fórmula será designada por 'butirato' ao longo do presente trabalho.

A formulação base dos 3 regimes teve em conta as necessidades alimentares dos leitões respeitando as recomendações do NRC (1998) para leitões entre 5-20 kg de PV. Foram fabricados 3 regimes experimentais distintos: regime de base que serviu de regime de controlo (RC), regime base com 0,25 % de butirato (B:0,25) e regime base com 0,50 % de butirato (B:0,50). Assim, o regime RC doseava 0 ppm, o regime B:0,25 doseava 2500ppm e o regime B:0,50 doseava 5000ppm de butirato.

A preparação dos regimes começou com a moenda do trigo num moinho de martelos móveis com crivo de 3 mm de diâmetro. Seguidamente realizou-se a pesagem das diferentes matérias-primas e a introdução destas num misturador horizontal com fita em espiral onde todos os ingredientes foram misturados por cerca de 10 minutos, de maneira a garantir uma boa miscigenação e a evitar a segregação de constituintes mais densos. Por último, os regimes sofreram um processo de granulação numa prensa granuladora com uma matriz com crivo de 3 mm. Após um período de arrefecimento o alimento composto já granulado foi armazenado.

3.3. Protocolo experimental

O período experimental durou cinco semanas, e iniciou-se após um período de adaptação dos leitões aos regimes que durou três dias.

O alimento foi distribuído numa refeição diária durante a primeira semana, após o que foi distribuído em duas refeições diárias até ao final do ensaio. O cálculo da quantidade a administrar a cada leitão era feito de maneira a deixar pelo menos 10 % de refugo, para assegurar um nível de ingestão de alimento *ad libitum*.

Durante todo o ensaio os animais foram pesados no início de cada semana.

Os refugos de alimento foram recolhidos individualmente todas as manhãs antes da distribuição de novo alimento, pesados, agrupados em lotes semanais (segunda a domingo), identificados individualmente e conservados por congelação (-20 °C) em arca frigorífica até ao seu processamento.

As fezes foram recolhidas individualmente todas as manhãs durante a primeira e a quarta semanas de ensaio, pesadas, identificadas individualmente e congeladas a -20 °C em arca frigorífica até ao seu processamento. Foram também observadas diariamente antes da sua recolha, sendo avaliada a sua consistência segundo uma escala de 0 a 3, de acordo com Marquardt *et al.* (1999) (Quadro 8).

Quadro 8 - 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

As urinas foram recolhidas individualmente todas as manhãs na primeira e na quarta semana de ensaio para recipiente onde se havia colocado previamente 5ml de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 5 % (por forma a impedir a rápida volatilização do azoto), pesadas, identificadas individualmente e congeladas a -20 °C em arca frigorífica até ao seu processamento.

No final das cinco semanas de ensaio os leitões foram abatidos após jejum de 12 h.

Ao abate realizou-se a recolha dos conteúdos intestinais para posterior determinação da MS, dos AGV, e da actividade enzimática microbiana. Recolheram-se também amostras de segmentos do intestino delgado: uma do duodeno (a cerca de 10 cm do piloro), do jejuno (a cerca de 5,5 m do piloro) e do íleo (a cerca de 60 cm da válvula íleo-cecal), imediatamente fixadas em formol tamponado, para posterior observação e medição das características morfológicas das criptas e das vilosidades intestinais.

O desenvolvimento do TGI foi controlado ao abate a partir 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 baço, do peso do pâncreas, do peso do fígado e do peso da vesícula biliar. Também foi medido o pH dos conteúdos do estômago, do íleo, do ceco e do cólon.

3.3.1. Preparação dos refugos e das amostras dos regimes alimentares, fezes e urinas

As amostras dos regimes alimentares foram moídas num moinho Retch com um crivo de 1 mm de diâmetro para posterior análise.

Os refugos recolhidos foram descongelados e colocados em tabuleiros de alumínio (previamente desumidificados a 103 °C em estufa durante 4 h) e pesados (peso do refugo húmido). Foram levados a secar em estufa a 103 °C até peso constante, após o que foram arrefecidos em exsicador e pesados (peso dos refugos secos) para posterior determinação da ingestão semanal de alimento.

As fezes recolhidas foram previamente descongeladas e homogeneizadas, após o que se recolheram amostras que foram introduzidas em tabuleiros de alumínio e pesadas (peso das fezes húmidas). Foram levadas à estufa a uma temperatura de 70 °C, onde ficaram a secar até peso constante, foram posteriormente arrefecidas em exsicador e pesadas (peso das fezes secas). As fezes já secas foram moídas num moinho Retch com um crivo de 1 mm de diâmetro e armazenadas em frascos individuais para posterior análise com vista a determinar a digestibilidade fecal aparente.

As urinas recolhidas foram previamente descongeladas e homogeneizadas, após o que se procedeu à colheita de uma amostra por leitão e por período que foi novamente congelada em frasco individual, para posterior determinação do balanço azotado.

3.4. Análises

3.4.1. Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis

Os AGV foram determinados ao nível dos conteúdos do íleo, ceco e cólon pelo método de Jouany (1982). Após o abate foram recolhidas amostras dos conteúdos do íleo, do ceco e do cólon para frascos onde previamente se colocou 2 ml de ácido ortofosfórico (0,03 M) e que foram conservadas a -20 °C. Para utilizar as amostras estas foram primeiro descongeladas em meio fresco e em seguida centrifugadas (centrifuga Beckman J2-HS) a 5000 rpm durante 20 min. Recolheu-se o sobrenadante resultante para dois *ependorf* (1 ml cada) que foram imediatamente congelados a -20 °C. Aquando da sua utilização as amostras contidas no *ependorf* foram descongeladas e 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 injetor e o detector estavam a 120 °C de temperatura, enquanto o forno se encontrava inicialmente a 120 °C (nos primeiros 7 min), e por cada minuto que passava foi aumentada em 10 °C até atingir os 170 °C de temperatura. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio. A separação e identificação dos AGV (acético, propiónico, butírico, isobutírico e isovalérico) foram realizadas num aparelho Perkin-Helmer, por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se como padrão interno o ácido metil valérico.

3.4.2. Determinação da actividade enzimática microbiana

Após o abate foram retiradas amostras do conteúdo do ceco e do cólon para frascos onde previamente se colocou 10 ml de uma solução tampão fosfato (pH 6) e foram conservadas a -80 °C. Previamente à sua utilização as amostras foram sujeitas a 2 ciclos de congelação e descongelação de maneira a promover a ruptura das membranas celulares. Depois cada amostra foi submetida a 4 ciclos sucessivos de sonicações que consistiam, cada um, em 30 s de sonicação (a 9 x 10 %) seguido de 30 s de repouso, sempre em meio fresco, após o que se procedeu à centrifugação (centrifuga Beckman J2-HS) das amostras a 15000 rpm durante 15 min. Recolheu-se o sobrenadante resultante, em duplicado para as três enzimas, para tubos de *ependorf* que foram imediatamente congelados a -20 °C. A determinação da actividade das enzimas decorreu de acordo com o método de Jehl *et al.* (1996).

Para a determinação foram utilizados tubos de ensaio contendo 5,25 ml do respectivo substrato (Pectina de citrinos Sigma P-9135, Xilana Sigma X-0502, Carboximetilcelulose Sigma C-5678) e 1,575 ml de solução tampão fosfato (pH 6), aos quais foi adicionado 5,25 µl de amostra e foram colocados em banho-maria a 39 °C. Os tempos de incubação estudados foram: 0 minutos, 30 minutos e 60 minutos. Para esses tempos foram introduzidos 700 µl de conteúdo dos tubos de ensaio para os *ependorfs* onde já se encontrava igual volume de DNSA (3,5 ácido-dinitrosalicílico) activado (1 ml de sulfito de sódio e 20 µl de glucose por cada 100 ml de DNSA), o que, juntamente com a colocação em banho de gelo, fez com que a reacção parasse. Os *ependorfs* foram introduzidos num banho-maria a 100 °C durante 20 min. Após esse tempo foram retirados e deixados a arrefecer, para que

adquirissem a cor final e assim se pudesse fazer a leitura da absorvância (575 nm de comprimento de onda) no espectrofotómetro (Hitachi U-2001 Spectrophotometer).

3.4.3. Morfologia da mucosa intestinal dos leitões

A análise da morfologia da mucosa intestinal consistiu na medição da profundidade das criptas e do comprimento e largura das vilosidades intestinais no duodeno, jejuno e íleo. Das amostras, recolhidas após o abate, de duodeno, jejuno e íleo, foram preparados cortes histológicos de 7 µm, corados e fixados com hematoxilina-eosina, sendo observados ao microscópio com objectiva de 10x. Tiraram-se as fotografias necessárias para reunir um número mínimo de 10 criptas e de 10 vilosidades por segmento e por animal, recorrendo a uma câmara digital (Olympus DP11) montada no microscópio (Olympus BX511). As imagens recolhidas foram posteriormente descarregadas para o computador e analisadas com o software Olympus DP Soft, permitindo a recolha de medidas das vilosidades e criptas intestinais.

3.4.4. Determinações analíticas a partir dos regimes alimentares, fezes e urinas

- *Matéria seca residual (MS)*: obtida através da secagem da amostra a 103 ° até peso constante, sendo expressa em percentagem da massa da amostra.

$$M. S. (\%) = \left(\frac{md}{ma} \right) \times 100$$

em que:

md – massa, em gramas, de amostra depois da secagem

ma – massa, em gramas, de amostra antes da secagem

- *Cinza*: obtida através da incineração da amostra numa mufla a 550 °C.
- 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, em gramas, de amostra.

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

3.4.5. Medição do pH dos conteúdos do TGI

A determinação foi realizada imediatamente após o abate de cada animal, procedendo-se à recolha das amostras do conteúdo do estômago, íleo, ceco e cólon que, após homogeneização, foram medidas com recurso ao aparelho WTW pH 522.

3.5. Cálculos

3.5.1. Performances de crescimento

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

$$\text{GMD} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{intervalo de tempo (dias)}}$$

- *Índice de conversão* (IC): quantidade de alimento ingerido pelo animal para este aumentar 1 kg de Peso Vivo.

$$\text{IC} = \frac{\text{alimento ingerido (kg)}}{\text{ganho de peso (kg)}}$$

O alimento ingerido é calculado pela diferença entre quantidade fornecida e refugada.

3.5.2. Digestibilidade fecal aparente

A digestibilidade fecal aparente exprime a quantidade de um dado nutriente que é absorvido pelo animal. A digestibilidade foi analisada através do cálculo do coeficiente de utilização digestiva aparente (CUDap) da MS, cinza, PB e fracções NDF e ADF.

$$\text{CUDap} = \left(\frac{\text{ing} - \text{exc. fezes}}{\text{ing}} \right)$$

3.5.3. Balanço azotado

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

$$\text{CRN} = \left(\frac{N \text{ ing} - N \text{ exc. fezes} - N \text{ exc. urina}}{N \text{ ing} - N \text{ exc. fezes}} \right)$$

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

$$\text{CUPN} = \left(\frac{N \text{ ing} - N \text{ exc. fezes} - N \text{ exc. urina}}{N \text{ ing}} \right)$$

3.6. Tratamento estatístico dos dados

O número de unidades experimentais foi reduzido a 23 devido à morte de 1 leitão 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 (semanas experimentais) 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 o único factor de variação, para tal recorrendo-se ao procedimento GML do programa SAS.

Sempre que 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. Parâmetros Zootécnicos

O PV médio inicial dos leitões foi de 6,73 kg (\pm 0,54 kg) e o PV médio final de 24,41 kg (\pm 2,96 kg) e, apesar de as diferenças de PV final entre os regimes não serem significativamente diferentes ($P=0,1366$), os leitões do RC apresentaram um PV final numericamente maior e os do grupo B:0,50 o menor (Quadro 9).

Os resultados obtidos sobre as performances de crescimento indicam que a ingestão de alimento foi significativamente influenciada pelo Período ($P<0,0001$), mas não pela inclusão de butirato de sódio na dieta ($P>0,05$). Observa-se assim um crescente aumento da ingestão (g/d) ao longo do ensaio.

Observando os dados relativos ao GMD, verifica-se novamente uma grande influência do Período ($P<0,0001$), mas não da dieta fornecida ($P=0,1525$). O GMD foi sempre crescente ao longo do ensaio, exceptuando-se na última semana. Por seu lado, a inclusão de butirato na dieta reduziu numericamente o GMD.

Quanto maior a inclusão de butirato na dieta maior o IC, com o regime B:0,25 a necessitar mais 0,13 kg de alimento para aumentar 1 kg de PV do que o regime controlo e o regime B:0,50, significativamente diferente dos restantes regimes ($P=0,0007$), a necessitar mais 0,82 kg de alimento para aumentar 1 kg de PV. O Período também influenciou significativamente o IC ($P<0,0001$), tendo o IC diminuído até à 3ª semana e aumentado nas últimas duas semanas.

O Índice Fecal avalia a consistência das fezes, sendo numericamente menor quanto mais moldadas estiverem as fezes observadas. Verificou-se que a influencia do regime administrado no Índice Fecal foi muito pequena ($P=0,7707$), mas a influencia do Período foi significativa ($P<0,0001$), tendo as fezes uma maior consistência a partir da 3ª semana experimental.

Quadro 9 - Efeito da composição do regime e do período experimental nas performances de crescimento e consistência fecal de leitões entre as 3 e as 8 semanas de idade.

	Regime			Período					Regime ⁽⁵⁾	Período ⁽⁵⁾	Reg x Per ⁽⁵⁾	DP ⁽⁶⁾
	RC ⁽³⁾ n = 8	B:0,25 ⁽³⁾ n = 7	B:0,50 ⁽³⁾ n = 8	1 ⁽⁴⁾	2 ⁽⁴⁾	3 ⁽⁴⁾	4 ⁽⁴⁾	5 ⁽⁴⁾				
PV inicial (kg)	6,77	6,63	6,78	-	-	-	-	-	0,8499	-	-	0,54
PV final (kg) ⁽¹⁾	25,53	24,96	22,73	-	-	-	-	-	0,1366	-	-	2,96
Ingestão												
g/dia	832	817	750	313	450	801	1145	1289	0,3873	<0,0001	0,5838	400
g/dia/kg	58,7	61,4	60,0	42,8	56,1	71,6	70,6	59,2	0,4090	<0,0001	0,7368	12,8
GMD (g)	557	547	482	139	267	648	845	746	0,1525	<0,0001	0,9602	299
IC	1,58 ^a	1,71 ^a	2,40 ^b	3,08	1,99	1,29	1,36	1,76	0,0007	<0,0001	<0,0001	1,05
Índice Fecal ⁽²⁾	0,993	1,030	1,190	1,780	1,550	0,820	0,600	0,610	0,7707	<0,0001	<0,0001	1,14

⁽¹⁾ No final do período experimental.

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

⁽³⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽⁴⁾ Período 1: leitões 25-31 dias de idade. Período 2: leitões 32-38 dias de idade. Período 3: leitões 39-45 dias de idade. Período 4: leitões 46-52 dias de idade. Período 5: leitões 53-57 dias de idade.

⁽⁵⁾ Valores de P para os efeitos: Regime, Período e interacção Regime x Período.

⁽⁶⁾ DP - Desvio Padrão.

4.2. Conteúdos do TGI: determinação da Matéria Seca e do pH

A composição do Regime não exerceu uma influencia estatisticamente significativa ($P>0,05$) sobre o teor de MS dos conteúdos intestinais dos leitões (Quadro 10), apesar de este ser numericamente inferior nos segmentos do íleo e do ceco quanto maior o teor de butirato administrado.

Relativamente ao pH, no estômago este foi tendencialmente mais ácido quanto maior a inclusão de butirato no regime ($P=0,0909$). Nos restantes segmentos analisados, não se verificaram grandes alterações no pH dos conteúdos intestinais entre grupos e entre segmentos.

Quadro 10 - Efeito da composição do regime na matéria seca e no pH dos conteúdos do TGI.

	RC ⁽¹⁾ n = 8	B:0,25 ⁽¹⁾ n = 7	B:0,50 ⁽¹⁾ n = 8	Regime ⁽²⁾	DPR ⁽³⁾
MS (%)					
Íleo	4,70	3,79	3,28	0,1487	1,40
Ceco	10,15	9,39	8,57	0,6381	3,30
Cólon	23,80	20,60	22,10	0,4289	4,65
pH					
Estômago	2,89	2,45	1,89	0,0909	0,86
Íleo	6,95	7,01	7,04	0,6002	0,18
Ceco	6,70	6,95	6,77	0,3079	0,31
Cólon	7,02	7,10	7,14	0,4682	0,21

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P para o efeito do regime.

⁽³⁾ DPR - Desvio Padrão da Residual.

4.3. Desenvolvimento do TGI dos leitões

Relativamente ao desenvolvimento do TGI (Quadro 11), apesar de um PV numericamente inferior, os leitões do grupo B:0,50 apresentaram um peso do estômago cheio (g/kg PV) significativamente superior aos outros dois grupos (+7,6 g/kg PV que o grupo RC e +6,5 g/kg PV que o grupo B:0,25; $P=0,0044$), bem como um peso do intestino delgado cheio significativamente superior ao do grupo de controlo (+9,6 g/kg PV; $P=0,0353$).

Ainda em relação ao intestino delgado, observou-se uma tendência para o aumento do seu peso em vazio com o aumento do teor em butirato no alimento composto fornecido ($P=0,0733$), mas a influência da suplementação com butirato no seu comprimento é limitada ($P=0,1666$).

Os dados recolhidos do intestino grosso indicam que a adição de butirato não teve influência no seu peso em cheio ($P=0,8340$), em vazio ($P=0,8918$) ou no seu comprimento ($P=0,4309$).

O peso dos órgãos anexos ao TGI (pâncreas e fígado) e do baço foi numericamente superior nos grupos suplementados com butirato quando comparados com o grupo de controlo, mas sem atingir o limite da significância estatística ($P=0,8373$; $P=0,8631$ e $P=0,3618$, respectivamente). O peso da vesícula biliar também não foi significativamente afectado pelo uso de butirato ($P=0,4082$).

Quadro 11 - Efeito da composição do regime no peso (g/kg peso vivo) dos componentes do aparelho digestivo e do baço.

	RC ⁽¹⁾ n = 8	B:0,25 ⁽¹⁾ n = 7	B:0,50 ⁽¹⁾ n = 8	Regime ⁽²⁾	DPR ⁽³⁾
PV (kg)	25,7	25,1	23,2	0,2697	3,07
Estômago					
Cheio	10,70 ^a	11,80 ^a	18,30 ^b	0,0044	4,30
Vazio	7,80	8,10	8,10	0,7658	0,98
Intestino delgado					
Cheio	41,20 ^a	44,10 ^{ab}	50,80 ^b	0,0353	6,96
Vazio	35,20	36,80	41,30	0,0733	4,93
Comprimento (m/kg)	0,626	0,655	0,710	0,1666	0,086
Intestino grosso					
Cheio	30,50	32,00	30,60	0,8340	5,40
Vazio	19,20	18,20	18,40	0,8918	4,50
Comprimento (m/kg)	0,128	0,125	0,137	0,4309	0,018
Pâncreas	2,41	2,55	2,52	0,8373	0,48
Fígado	25,10	25,80	25,70	0,8631	2,59
Vesícula	1,09	0,98	1,24	0,4082	0,36
Baço	2,35	2,84	2,51	0,3618	0,64

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P para o efeito do regime.

⁽³⁾ DPR - Desvio Padrão da Residual.

4.4. Morfologia da mucosa intestinal

As alterações promovidas pelo butirato na morfologia da mucosa intestinal foram avaliadas pela medição da altura e largura das vilosidades, profundidade das criptas e rácio entre altura das vilosidades e profundidade das criptas ao nível do duodeno, jejuno e íleo (Quadro 12).

Após a análise dos dados obtidos, verificou-se que a utilização de butirato não teve influencia estatística na morfologia da mucosa intestinal ($P>0,05$) para qualquer dos segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo).

Quadro 12 - Efeito da composição do regime na morfologia da mucosa intestinal.

	RC ⁽¹⁾ n = 8	B:0,25 ⁽¹⁾ n = 7	B:0,50 ⁽¹⁾ n = 8	Regime ⁽²⁾	DPR ⁽³⁾
Altura vilosidades (µm)					
Duodeno	398,8	361,3	394,0	0,3039	49,0
Jejuno	401,5	347,9	396,1	0,1442	54,6
Íleo	329,4	363,2	344,0	0,4954	54,2
Largura vilosidades (µm)					
Duodeno	204,5	204,2	196,3	0,5423	16,3
Jejuno	170,0	166,0	173,0	0,6802	15,4
Íleo	169,4	193,2	180,5	0,1593	22,9
Profundidade criptas (µm)					
Duodeno	613,0	554,9	585,3	0,3380	74,3
Jejuno	395,6	399,0	393,1	0,9679	44,3
Íleo	318,1	306,9	341,2	0,2051	36,8
Altura vilosidades / Profundidade criptas					
Duodeno	0,663	0,661	0,689	0,9152	0,145
Jejuno	1,029	0,895	1,026	0,4277	0,220
Íleo	1,039	1,206	1,011	0,1591	0,200

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P do efeito regime.

⁽³⁾ DPR - Desvio Padrão da Residual.

4.5. Digestibilidade fecal aparente

Relativamente à digestibilidade fecal aparente do regime (Quadro 13), verifica-se que, na generalidade, o factor com maior influência foi a idade dos leitões (Período) e não a inclusão de butirato no regime.

No caso da MS, tanto a inclusão de butirato como o Período de estudo melhoraram numericamente o CUD aparente, porém sem significância estatística (P=0,2205 e P=0,1642, respectivamente).

Quanto à digestibilidade da fracção mineral do regime, a inclusão de butirato teve tendência (P=0,0558) para melhorar a digestibilidade desta fracção (no período 1: B:0,25 +6,9 % e B:0,50 +17,1 % e no período 2: B:0,25 +7,7 % e B:0,50 +1,5 %, em relação ao regime controlo), não tendo o efeito do Período alcançado o limiar de significação estatística (P=0,5820).

Em relação à PB, o Período aumentou significativamente ($P < 0,0001$) o CUD aparente da PB, mas o Regime não teve influência significativa ($P = 0,3651$) neste ponto.

No caso da porção fibrosa do alimento, o Período foi significativamente importante ($P < 0,0001$), diminuindo o CUD aparente do NDF e do ADF, sendo que o efeito do butirato apenas atingiu o limiar de significância estatística na digestibilidade da fracção ADF ($P = 0,0165$), tendo o regime B:0,25 promovido um aumento de +36,0 % e +45,4 % do CUD aparente da fracção ADF e o regime B:0,50 um aumento de +45,8 % e +5,9, em relação ao grupo RC no período 1 e 2, respectivamente.

Analisando a interacção dos factores Regime e Período, verifica-se que esta foi influente no CUD aparente das cinzas ($P = 0,0138$) e nas fracções NDF e ADF ($P < 0,05$).

Verifica-se também uma influência estatisticamente significativa ($P < 0,05$) da interacção do Regime e do Período na digestibilidade da fracção mineral do regime, bem como nas fracções NDF e ADF.

Quadro 13 - Efeito da composição do regime e do período experimental na digestibilidade fecal aparente do regime.

Regime	RC ⁽¹⁾		B:0,25 ⁽¹⁾		B:0,50 ⁽¹⁾		Regime ⁽³⁾	Período ⁽³⁾	Reg x Per ⁽³⁾	DP ⁽⁴⁾
	n = 8	n = 8	n = 7	n = 7	n = 8	n = 8				
Período ⁽²⁾	1	2	1	2	1	2				
Ingestão (g/dia)	282	1120	257	1190	261	1022	0,2992	<0,0001	0,2055	466
CUDap										
MS	0,860	0,879	0,861	0,883	0,890	0,878	0,2205	0,1642	0,0919	0,024
Cinzas	0,626 ^a	0,648 ^{ab}	0,669 ^{ab}	0,698 ^{bc}	0,733 ^c	0,658 ^{ab}	0,0558	0,5820	0,0138	0,066
PB	0,795	0,848	0,788	0,873	0,822	0,854	0,3651	<0,0001	0,1082	0,043
NDF	0,749 ^a	0,668 ^b	0,773 ^{ac}	0,685 ^b	0,816 ^c	0,652 ^b	0,4827	<0,0001	0,0400	0,079
ADF	0,419 ^a	0,269 ^b	0,570 ^c	0,391 ^{ab}	0,611 ^c	0,285 ^b	0,0165	<0,0001	0,0451	0,167

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Período 1: leitões 25-29 dias de idade. Período 2: leitões 46-50 dias de idade.

⁽³⁾ Valores de P para os efeitos: Regime, Período e interacção Regime X Período.

⁽⁴⁾ DP - Desvio padrão.

4.6. Balanço azotado

O Quadro 14 reúne os valores referentes ao balanço azotado. O regime fornecido teve um efeito estatisticamente significativo na quantidade de azoto retida pelos leitões (azoto retido diariamente $P=0,0285$; azoto retido diariamente por kg de PV $P=0,0504$ e azoto retido diariamente por kg de peso metabólico $P=0,0287$), mas não atingiu o limiar de significância estatística no efeito sobre a quantidade de azoto ingerida, nem no CRN ou no CUPN ($P=0,5115$ e $P=0,4276$, respectivamente). Contudo, verifica-se que, numericamente e em relação ao grupo RC, o regime B:0,25 conduziu a maiores valores de ingestão azotada e o regime B:0,50 a valores menores de azoto ingerido. Quanto à retenção de azoto, e respectivamente em relação ao período 1 e 2, houve uma diminuição de 13,0 % e um aumento de 24,3 % no grupo B:0,25 e uma diminuição de 6,9 % e de 13,4 % no grupo B:0,50 no azoto retido por dia ($P=0,0285$), uma diminuição de 9,1 % e um aumento de 29,2 % no grupo B:0,25 e uma diminuição, apenas no período 2, de 5,0 % no grupo B:0,50 na quantidade de azoto retida diariamente por kg de PV ($P=0,0504$), e uma diminuição de 11,0 % e um aumento de 28,5 % com 0,25 % de butirato na dieta e uma diminuição de 3,3 % e de 7,0 % com a inclusão de 0,50 % de butirato na quantidade de azoto retido diariamente por kg de peso metabólico ($P=0,0287$).

O factor Período teve uma influencia estatisticamente significativa ($P<0,05$) na ingestão e retenção de azoto pelos animais, bem como no CRN e CUPN, tendo conduzido a aumentos em todos eles.

É ainda possível observar que a interacção entre os factores Regime e Período só foi significativamente influente na quantidade de azoto retida por dia ($P=0,0130$) e na quantidade de azoto retido diariamente por kg de peso metabólico ($P=0,0320$) tendo, do período 1 para o período 2 e em ambos os casos, o grupo B:0,25 registado o maior aumento e o grupo B:0,50 o menor.

No Quadro 15 são apresentados os resultados respeitantes à excreção azotada. O Regime não demonstrou ter um efeito estatisticamente significativo quer na quantidade de azoto excretado nas fezes, quer na quantidade de azoto excretada na urina ($P>0,10$).

O azoto excretado nas fezes e na urina foi significativamente afectado pelo Período, verificando-se, do período 1 para o 2, um aumento na quantidade de azoto excretado diariamente.

A interacção entre o Regime e o Período não teve qualquer efeito significativo na excreção fecal e urinária de azoto ($P>0,05$).

Quadro 14 - Efeito da composição do regime e do período experimental no balanço azotado dos leitões.

Regime	RC ⁽¹⁾		B:0,25 ⁽¹⁾		B:0,50 ⁽¹⁾		Regime ⁽³⁾	Período ⁽³⁾	Reg X Per ⁽³⁾	DP (1)
	n = 8	n = 8	n = 7	n = 7	n = 8	n = 8				
Período ⁽²⁾	1	2	1	2	1	2				
N ingerido										
g/dia	8,72	34,69	7,87	36,47	7,76	30,37	0,1349	<0,0001	0,1301	13,60
g/dia/kg	1,20	2,02	1,07	2,22	1,12	2,00	0,3205	<0,0001	0,2289	0,52
g/dia/kg ^{0,75}	1,96	4,10	1,75	4,47	1,82	3,93	0,1451	<0,0001	0,1618	1,22
N retido										
g/dia	4,07 ^a	20,30 ^b	3,54 ^a	25,23 ^c	3,79 ^a	17,58 ^b	0,0285	<0,0001	0,0130	9,43
g/dia/kg	0,55	1,20	0,50	1,55	0,55	1,14	0,0504	<0,0001	0,0628	0,45
g/dia/kg ^{0,75}	0,91 ^a	2,42 ^b	0,81 ^a	3,11 ^c	0,88 ^a	2,25 ^b	0,0287	<0,0001	0,0320	0,98
CRN	0,548	0,702	0,575	0,797	0,580	0,675	0,5115	0,0018	0,5150	0,17
CUPN	0,436	0,594	0,451	0,695	0,477	0,575	0,4276	0,0002	0,2982	0,15

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Período 1: leitões 25-29 dias de idade. Período 2: leitões 46-50 dias de idade.

⁽³⁾ Valores de P para os efeitos: Regime, Período e interação Regime x Período.

⁽⁴⁾ DP - Desvio Padrão.

Quadro 15 - Efeito da composição do regime e do período experimental na excreção azotada.

	RC ⁽¹⁾ n = 8	B:0,25 ⁽¹⁾ n = 7	B:0,50 ⁽¹⁾ n = 8	Período 1 ⁽²⁾	Período 2 ⁽²⁾	Regime ⁽³⁾	Período ⁽³⁾	Reg X Per ⁽³⁾	DP ⁽⁴⁾
N fezes									
g/dia	3,49	3,16	2,93	1,58	4,81	0,3041	<0,0001	0,7485	1,90
g/dia/kg	0,27	0,26	0,24	0,22	0,29	0,3563	0,0004	0,6012	0,06
g/dia/kg. ^{0,75}	0,51	0,48	0,45	0,37	0,59	0,3262	<0,0001	0,7095	0,16
N urina									
g/dia	6,03	4,59	5,45	2,72	8,00	0,5229	<0,0001	0,6081	4,12
g/dia/kg	0,46	0,38	0,47	0,38	0,49	0,4398	0,0734	0,5287	0,20
g/dia/kg. ^{0,75}	0,86	0,69	0,86	0,62	0,98	0,4792	0,0040	0,5598	0,42
N excretado total									
g/dia	9,52	7,75	8,38	4,30	12,80	0,4079	<0,0001	0,5443	5,49
g/dia/kg	0,73	0,63	0,72	0,61	0,78	0,3973	0,0070	0,4048	0,22
g/dia/kg. ^{0,75}	1,37	1,17	1,31	0,99	1,57	0,4135	<0,0001	0,4662	0,49

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Período 1: leitões 25-29 dias de idade. Período 2: leitões 46-50 dias de idade.

⁽³⁾ Valores de P para os efeitos: Regime, Período e interacção Regime x Período.

⁽⁴⁾ DP - Desvio Padrão.

4.7. Actividade enzimática microbiana

Os dados sobre a actividade enzimática microbiana reportam-se à actividade da Xilanase, Pectinase e Celulase de origem microbiana nos segmentos do ceco e do cólon (Quadro 16).

Estatisticamente não foi encontrada qualquer influencia significativa do teor de butirato incluído no regime na actividade enzimática para qualquer das enzimas analisadas ($P > 0,05$). Porém, numericamente detecta-se uma ligeira diminuição da actividade enzimática quanto maior o teor de butirato fornecido pelo regime, transversal às 3 enzimas e aos conteúdos do ceco e do cólon.

Quadro 16 - Efeito da composição do regime na actividade enzimática microbiana (mg/ml).

	RC ⁽¹⁾ n = 8	B:0,25 ⁽¹⁾ n = 7	B:0,50 ⁽¹⁾ n = 8	Regime ⁽²⁾	DPR ⁽³⁾
Ceco					
Xilanase	219,0	220,6	154,7	0,2110	81,0
Pectinase	269,4	237,0	215,1	0,2639	64,6
Celulase	135,7	132,5	99,8	0,2343	43,7
Cólon					
Xilanase	279,3	269,9	263,9	0,9439	91,1
Pectinase	335,9	283,2	279,9	0,3313	81,5
Celulase	163,0	149,8	152,1	0,8328	45,4

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P para o efeito do regime.

⁽³⁾ DPR - Desvio padrão da residual.

4.8. AGV nos conteúdos intestinais

Íleo

Ao analisar os dados dos teores de AGV nos conteúdos ileais (Quadro 17), verifica-se que o regime fornecido influenciou significativamente a produção de ácido acético ($P=0,0003$), propiónico ($P<0,0001$) e isobutírico ($P=0,0011$), mas não no caso dos restantes AGV analisados ($P>0,05$). Isto conduziu a uma diminuição do teor de ácido acético de 84,3 %, no caso do regime B:0,25, e 73,1 %, no caso do caso do regime B:0,50; uma diminuição do teor de ácido propiónico de 85,6 %, no caso do regime B:0,25, e 85,4 %, no caso do caso do regime B:0,50; e uma diminuição do teor de ácido isobutírico de 80,8 %, no caso do regime B:0,25, e 68,3 %, no caso do caso do regime B:0,50, quando comparando com os teores encontrados no grupo RC. Assim, constata-se que o Regime influenciou significativamente o teor total de AGV neste segmento do intestino ($P<0,0001$), levando o

regime B:0,25 a uma redução de 84,5 % e o regime B:0,50 a uma redução de 76,8 %, em comparação com o regime de controlo.

Porém, apesar da redução significativa do teor em AGV neste segmento do TGI, as proporções molares entre os diferentes AGV consideradas não sofreram alterações estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Quadro 17 - Efeito da composição do regime nos AGV dos conteúdos ileais.

	RC ⁽¹⁾	B:0,25 ⁽¹⁾	B:0,50 ⁽¹⁾	Regime	DPR ⁽²⁾
AGV (mmol/l)⁽³⁾					
C2	16,22 ^a	2,55 ^b	4,37 ^b	0,0003	5,76
C3	4,92 ^a	0,71 ^b	0,72 ^b	<0,0001	1,05
C4	2,81	0,26	0,42	0,1605	2,77
IC4	1,20 ^a	0,23 ^b	0,38 ^b	0,0011	0,46
C5	0,90	0,27	0,15	0,2888	0,96
Total	26,04 ^a	4,03 ^b	6,05 ^b	<0,0001	8,47
Proporção molar					
C2:C3	3,15	3,61	3,11	0,8859	2,11
C2:C4	1,86	1,59	0,34	0,4911	2,55
C3:C4	0,70	0,96	0,11	0,5454	1,47
(C2:C3+C4)	2,39	3,18	2,84	0,7955	2,27
(C2:total)	0,63	0,60	0,74	0,1300	0,14

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P para efeito do regime. DPR: desvio padrão da residual.

⁽³⁾ C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico, C5: Isovalérico.

Ceco

Os dados relativos ao efeito do butirato no teor de AGV nos conteúdos do ceco (Quadro 18) permitem constatar que o regime B:0,50 teve uma influência significativa no teor em ácido butírico ($P=0,0052$), isobutírico ($P=0,0187$) e no total dos AGV analisados ($P=0,0145$), e que a adição de butirato ao regime promoveu alterações significativas no teor em ácido isovalérico ($P=0,0018$), tendo também demonstrado uma tendência no teor em ácido acético ($P=0,0621$) e propiónico ($P=0,0553$). Assim, comparando com o grupo alimentado com o regime de controlo, o regime B:0,25 aumentou significativamente o teor em ácido isovalérico (+68,4 %); o regime B:0,50 aumentou significativamente o teor em ácido butírico (+134,2 %), isobutírico (+43,3 %) e isovalérico (+132,4 %), bem como o total de AGV (+56,3 %). Sendo o regime B:0,50 aquele que proporcionou as maiores diferenças, é interessante verificar que, quando comparado com a média dos valores registados nos grupos RC e B:0,25, levou à produção de +94,9 % de ácido butírico, +35,5 % de ácido isobutírico e +44,5 % do total de AGV.

As proporções molares consideradas foram significativamente influenciadas pelo regime fornecido aos animais ($P < 0,01$), à exceção da proporção entre ácido acético e propiónico ($P = 0,3302$). A proporção entre ácido acético e butírico foi significativamente diferente nos três regimes e, em comparação com o RC, foi 22,4 % inferior no grupo B:0,25 e 44,1 % inferior no grupo B:0,50. A proporção entre ácido propiónico e butírico foi significativamente diferente no regime B:0,50; levando a uma redução de 49,4 % em relação ao regime B:0,25 e de 85,9 % em relação ao RC. A proporção C2:(C3+C4) foi significativamente alterada pela adição de butirato ao regime, tendo o regime B:0,25 provocado uma diminuição de 13,6 % e o regime B:0,50 de 22,3 %, em comparação com o grupo de controlo. A proporção entre ácido acético e o total de AGV analisados foi significativamente alterada, verificando-se que o regime B:0,50 conduziu a uma redução em 10,7 % da mesma, quando comparando com o RC. Verifica-se assim a utilização de butirato na alimentação dos leitões provocou uma redução da produção de ácido acético.

Quadro 18 - Efeito da composição do regime nos AGV dos conteúdos cecais.

	RC ⁽¹⁾	B:0,25 ⁽¹⁾	B:0,50 ⁽¹⁾	Regime	DPR ⁽²⁾
AGV (mmol/l)⁽³⁾					
C2	29,86	31,51	41,00	0,0621	9,44
C3	10,44	12,43	14,52	0,0553	3,15
C4	7,61 ^a	10,68 ^a	17,82 ^b	0,0052	5,62
IC4	2,61 ^a	2,91 ^a	3,74 ^b	0,0187	4,88
C5	2,50 ^a	4,21 ^b	5,81 ^b	0,0018	1,57
Total	53,02 ^a	61,74 ^a	82,89 ^b	0,0145	18,88
Proporção molar					
C2:C3	2,87	2,58	2,82	0,3302	0,38
C2:C4	4,29 ^a	3,33 ^b	2,40 ^c	0,0009	0,84
C3:C4	1,58 ^a	1,27 ^a	0,85 ^b	0,0023	0,36
(C2:C3+C4)	1,66 ^a	1,44 ^b	1,29 ^b	0,0024	0,19
(C2:Ctotal)	0,56 ^a	0,52 ^{ab}	0,50 ^b	0,0086	0,04

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P para efeito do regime. DPR: desvio padrão da residual.

⁽³⁾ C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico, C5: Isovalérico.

Cólon

Analisando os dados relativos ao efeito da adição de butirato ao regime alimentar no teor em AGV dos conteúdos do cólon (Quadro 19) verifica-se que não houve alterações estatisticamente significativas nos teores dos AGV determinados nem nas proporções entre eles ($P > 0,05$). Porém encontra-se uma tendência ($P = 0,0690$) para a redução do teor em ácido propiónico nos conteúdos deste segmento do TGI com o aumento do teor de butirato na dieta.

Quadro 19 - Efeito da composição do regime nos AGV dos conteúdos do cólon.

	RC ⁽¹⁾	B:0,25 ⁽¹⁾	B:0,50 ⁽¹⁾	Regime	DPR ⁽²⁾
AGV (mmol/l) ⁽³⁾					
C2	7,03	6,34	5,59	0,1561	1,34
C3	2,36	2,06	1,74	0,0690	0,48
C4	4,36	3,65	3,49	0,2433	1,02
IC4	1,01	0,75	0,70	0,2680	0,38
C5	1,61	1,29	1,10	0,2390	0,57
Total	16,4	14,09	12,62	0,1412	3,50
Proporção molar					
C2:C3	3,04	3,13	3,18	0,7817	0,39
C2:C4	1,67	1,83	1,62	0,4778	0,34
C3:C4	0,54	0,58	0,51	0,1991	0,08
(C2:C3+C4)	1,07	1,15	1,07	0,6444	0,18
(C2:Ctotal)	0,44	0,46	0,44	0,6985	0,05

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC + 0,25 % de butirato; B:0,50: RC + 0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Valores de P para efeito do regime. DPR: desvio padrão da residual.

⁽³⁾ C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Butírico, IC4: Isobutírico, C5: Isovalérico.

5. Discussão

5.1. Parâmetros Zootécnicos

As diferenças entre regimes no PV final não foram significativas, no entanto os leitões do RC apresentaram um PV final numericamente maior (RC = 25,53 kg, B:0,25 = 24,96 kg e B:0,50 = 22,73 kg), o que não está de acordo com Biagi *et al.* (2007), que num estudo com 48 leitões ($6,68 \pm 0,13$ kg PV) alojados em jaulas individuais durante 6 semanas, verificaram que os leitões que receberam a dieta contendo 4000 ppm de butirato de sódio mostraram um PV final numericamente melhor (28 kg vs 26,8 kg) que os animais de controlo.

A adição de butirato não teve qualquer efeito significativo na ingestão ou no GMD, o que está de acordo com Tonel (2009) e também com Biagi *et al.* (2007), mas não com Weber e Kerr (2008), Gálfi e Bokori (1990), Piva *et al.* (2002) e Kotunia *et al.* (2004) (ver Quadro 2). Verifica-se no entanto uma diminuição numérica na ingestão (g/dia) quanto maior o teor de butirato na dieta, o que poderia levar a pensar numa menor ingestão de butirato. Porém tal não se verifica, ingerindo o grupo B:0,25 diariamente cerca de 2,04 g de butirato e o grupo B:0,50 quase o dobro (3,75 g de butirato). Verifica-se ainda que quanto maior a inclusão de butirato na dieta maior o IC, sendo o IC do regime B:0,50 significativamente maior que os restantes. Isto pode estar relacionado com o facto de o butirato poder promover outros gastos energéticos, como por exemplo a estimulação do sistema imunitário, que irão diminuir a eficiência de utilização alimentar (Demas *et al.*, 1997, e Pérez-Bosque *et al.*, 2004, citados por Nofrarías *et al.*, 2007). Esta menor eficiência alimentar com o uso de butirato foi também constatada por Tonel (2009), Piva *et al.* (2002) e Gálfi e Bokori (1990), e que, segundo os autores, está provavelmente relacionada com o facto de o butirato ter estimulado o consumo de alimento sem uma utilização dos nutrientes igualmente eficaz. Já Weber e Kerr, (2008) e Biagi *et al.* (2007) não detectaram qualquer efeito da adição butirato no IC geral (ver Quadro 2).

A ingestão aumenta ao longo do ensaio mediante o aumento da capacidade do estômago para armazenagem de alimento e aumento das necessidades alimentares diárias do animal. Também o facto de os leitões estarem sujeitos a um stress multifactorial ao desmame contribui para menores ingestões neste período, que vão sendo ultrapassadas à medida que o seu TGI e a microflora presente neste se vão adaptando ao novo tipo de alimentação. O GMD aumentou ao longo do ensaio, acompanhando o aumento da ingestão e da adaptação dos animais aos regimes. Em relação ao IC este diminuiu até meio do período experimental e aumentou nas últimas duas semanas. Este modelo de variação do IC e o menor GMD na última semana IC podem ser justificados pela menor ingestão por kg PV nas últimas duas semanas, causada pelo aumento da quantidade de alimento refugada pelos animais, o que está possivelmente relacionado com as jaulas individuais subdimensionadas para suínos com mais de 20 kg PV. Também o facto de os animais aumentarem a síntese diária de gordura corporal com a idade, que é energeticamente mais custoso do que a deposição proteica, pode ter contribuído para os menores valores de GMD e piores de IC na parte final do período experimental.

Relativamente ao Índice Fecal verificou-se que a influencia do Período foi mais significativa que o Regime administrado, tendo as fezes uma aparência mais normal quanto mais próximo do final do ensaio, o que se relaciona claramente com a adaptação do animal ao regime. A melhor adaptação da mucosa do TGI e da actividade das enzimas endógenas dos leitões e da microflora bacteriana ao regime fornecido promove a menor incidência de diarreias.

Em conclusão, as diferenças na quantidade e na composição do butirato fornecido aos leitões nos diferentes ensaios experimentais, bem como as diferenças na idade dos animais, podem justificar os resultados contraditórios sobre o efeito deste ácido orgânico sobre o crescimento dos leitões.

5.2. pH Intestinal

O pH no estômago mostrou uma tendência ($P=0,0909$) para ser mais ácido quanto maior a inclusão de butirato no regime, mas nos restantes segmentos do TGI analisados não se encontraram diferenças significativas entre tratamentos. Também Tonel (2009) verificou que o pH dos conteúdos dos diferentes compartimentos não foi significativamente afectado pelo regime alimentar, embora numericamente o pH no estômago tenha sido mais ácido nos regimes suplementados com diferentes fontes de butirato que no regime de controlo. Segundo Bugaut (1987), citado por Manzanilla *et al.* (2006), existem duas explicações para o facto: (1) a conversão do butirato para outras substâncias ou (2) a absorção do butirato na parte esofágica do estômago, opinião também partilhada por Ichikawa *et al.* (2002) citados por Tonel (2009), que defendem que, sendo o butirato de sódio um ácido fraco e ingerido em pequenas doses, é parcialmente absorvido no estômago não influenciando o pH no restante TGI. De facto, o ácido butírico tem um $pK_a=4,82$, e segundo Partanen e Mroz (1999) a sua absorção é muito rápida em pH inferior ao seu pK_a (pH do estômago $< 2,9$ em todos os regimes), mas permanece na sua forma dissociada e é fracamente absorvido a pH 5-6 (pH dos intestinos > 6 em todos os regimes). Porém, o butirato utilizado é uma fórmula química complexa (com sais de sódio, cálcio e potássio, e ainda ácidos gordos alimentares), sendo necessário provar a sua absorção anterior à chegada aos intestinos.

Já no ensaio desenvolvido por Biagi *et al.* (2007), o pH do estômago e do intestino delgado não foi afectado pelo tratamento, mas o pH cecal foi linearmente aumentado pelo butirato de sódio, facto para o qual os autores não encontraram explicação.

5.3. Actividade enzimática microbiana e os AGV nos conteúdos intestinais

Foi detectada actividade enzimática da Xilanase, Pectinase e Celulase no ceco e cólon, sem contudo haver diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos. Tendo os animais sido sacrificados com cerca de oito semanas de idade, é normal que já tenham desenvolvido alguma maturidade do TGI e estabilizado a microflora intestinal, o que lhes permite a digestão de nutrientes de origem vegetal. Pelo contrário, Tonel (2009) verificou uma diminuição significativa da actividade da

celulase e da xilanase no ceco dos animais suplementados com butirato de sódio. Também Castillo *et al.* (2006) verificaram que ao usar 3000 ppm de butirato de sódio em leitões desmamados aos 18/22 dias ($6,0 \pm 0,1$ kg PV inicial) não foi detectada qualquer actividade de celulase ou xilanase mas consideráveis actividades de amilase e amilopectinase, todavia sem diferença entre dietas, o que, segundo os autores, pode estar relacionada com uma adaptação insuficiente do microbiota à complexa digestão dos hidratos de carbono tais como a celulose ou a hemicelulose nos animais jovens.

O teor de AGV no **íleo** foi inferior ao teor de AGV determinado no ceco e no cólon, o que está de acordo com a bibliografia (Canibe *et al.*, 2001). Isto justifica-se pelo facto de a população microbiana no íleo ser inferior e com composição díspar da população microbiana que se encontra tanto no ceco como no cólon. Segundo Partanen e Mroz (1999), no estômago e intestino delgado predominam os *Lactobacillus* que produzem ácido láctico como resultado da fermentação dos açúcares. Assim, é de esperar uma maior concentração de ácido láctico em relação ao acético, propiónico e butírico no íleo.

A menor concentração de AGV no íleo com o uso de butirato pode justificar-se tanto por uma menor produção como por melhor absorção. No entanto, a ausência de efeitos na morfologia da mucosa intestinal (Quadro12) não parece sugerir um aumento da capacidade de absorção, pelo que será mais provável uma redução na quantidade de AGV produzidos. Isto poderá ser devido a um trânsito digestivo mais rápido, o que não pode ser confirmado pelos resultados obtidos, ou por um efeito do butirato na multiplicação dos microrganismos do íleo como, por exemplo, os *Lactobacillus* em detrimento das bactérias produtoras de AGV. Isto poderia ser benéfico para a saúde intestinal do leitão, uma vez que, segundo Ewing e Cole (1994), citados por Castillo *et al.* (2006), os *Lactobacillus* são reconhecidos como fazendo parte da microflora benéfica.

No **ceco** os resultados sugerem um aumento da produção de ácido butírico, isobutírico e isovalérico com a utilização de butirato. O aumento do teor de ácido butírico pode traduzir a chegada deste ácido fornecido pelo regime, sendo interessante constatar que a subida é maior no regime B:0,50 quando os leitões ingeriam por dia mais de 3,75 g de butirato. O aumento do teor de ácido isobutírico e isovalérico pode também traduzir uma maior degradação de compostos azotados no ceco dos leitões que receberam a dieta suplementada com butirato. É importante recordar que os ácidos acético, propiónico e butírico formam-se por degradação da fracção fibrosa da dieta (Partanen e Mroz, 1999), mas os ácidos isobutírico e isovalérico formam-se por degradação de compostos proteicos. A alteração da proporção molar dos AGV pode traduzir um efeito do butirato no equilíbrio da microflora cecal com redução das bactérias formadoras de ácido acético.

A ausência de efeitos significativos do butirato na concentração e proporção molar dos AGV ao nível do **cólon** está de acordo com uma actividade enzimática microbiana que não variou entre os regimes (Quadro 16). Esta consonância sugere que o butirato parece não exercer qualquer efeito na actividade microbiana do cólon. O facto de diversos autores sugerirem que o butirato pode ser absorvido nos compartimentos proximais do tubo digestivo (Bugaut, 1987, citado por Manzanilla *et al.*, 2006, Ichikawa *et al.*, 2002, citados por Tonel, 2009, Biagi *et al.*, 2007) poderá justificar estes resultados. Contudo, o butirato utilizado neste ensaio é uma fórmula química complexa, envolvendo

sais de sódio, cálcio e potássio, protegidos por ácidos gordos, sendo portanto necessário provar a sua absorção antes de entrar no cólon para total esclarecimento desta questão.

Em outros estudos, como Manzanilla *et al.* (2006) e Tonel (2009), verificou-se que o tratamento com butirato de sódio levou a uma menor produção de AGV devido a uma melhor eficiência alimentar e consequente diminuição da actividade fermentativa no intestino grosso.

5.4. Morfologia da mucosa intestinal

Segundo Gálfi e Bokori (1990), Manzanilla *et al.* (2006) e Biagi *et al.* (2007) não se pode esperar um efeito directo entre o butirato de sódio e o epitélio intestinal, visto nos seus estudos a concentração de butirato ter aumentado no estômago dos animais do tratamento com butirato de sódio mas não no restante TGI. Isto é explicado pelo facto de os ácidos orgânicos indissociados poderem atravessar facilmente membranas, dificilmente chegando ao intestino grosso se não estiverem protegidos.

Após a análise dos dados obtidos neste estudo, verificou-se que a utilização de butirato não conduziu a diferenças estatisticamente significativas na morfologia da mucosa intestinal em qualquer dos segmentos analisados. Se analisarmos estes dados conjuntamente com a influência do butirato no pH dos conteúdos do TGI, é possível especular que o butirato foi em grande parte dissociado/absorvido no estômago, razão pela qual não chegou ao restante TGI nem nele teve efeitos. Isto está de acordo com os estudos de Kotunia *et al.* (2004), Biagi *et al.* (2007) e Tonel (2009), nos quais a avaliação morfológica das vilosidades e criptas intestinais não revelou diferenças significativas entre os tratamentos. Porém Gálfi e Bokori (1990) e Manzanilla *et al.* (2006) obtiveram efeito nas vilosidades do íleo e criptas do ceco, e efeito nas criptas do jejuno, respectivamente (Quadro 3).

Segundo Biagi *et al.* (2007), a razão para a ausência de maiores efeitos do butirato na morfologia intestinal pode ser a rápida metabolização do butirato antes de este atingir os intestinos e/ou o facto de as amostras de mucosa intestinal serem colhidas no final do ensaio, cerca de 6 semanas após o desmame, logo em leitões com um TGI quase totalmente desenvolvido. Isto porque, segundo Piva *et al.* (2002), a eficácia do butirato é maior no período imediatamente após o desmame em virtude de a estrutura da mucosa intestinal se encontrar comprometida.

5.5. Desenvolvimento do TGI dos leitões

Os animais do grupo B:0,50 apresentaram um peso do estômago cheio e do intestino delgado cheio (g/kg PV) significativamente superior aos do grupo de controlo. Sabendo também que o nível de ingestão e o teor de MS nos intestinos foi numericamente menor quanto maior o teor de butirato na dieta, isto pode indicar que o transito digestivo foi mais lento nos animais suplementados. Ou seja, o tempo de permanência do digesta no TGI foi maior, aumentando assim a sensação de saciedade dos animais.

A tendência para aumento de peso do intestino delgado vazio no caso dos leitões que receberam o regime suplementado com butirato pode indiciar um estímulo deste aditivo no desenvolvimento da parede intestinal. Contudo a ausência de efeito significativo do butirato na morfologia da mucosa intestinal (Quadro 12) não permite confirmar esta hipótese.

De acordo com a literatura, Kotunia *et al.* (2004) verificaram que a adição de 3000 ppm de butirato de sódio ao leite fornecido a leitões com 3 dias tendeu a estimular o crescimento da porção distal do intestino delgado, mas Tonel (2009) concluiu uma tendência para o decréscimo do peso dos intestinos consecutivo à ingestão de um regime com butirato de sódio por leitões entre as 3 e 8 semanas de idade, porém em nenhum dos casos se atingiu o limiar de significância estatística (Quadro 3).

Estes resultados contraditórios não permitem uma conclusão definitiva sobre o potencial efeito do butirato no desenvolvimento do TGI.

5.6. Digestibilidade e Balanço Azotado

O regime utilizado não influenciou de forma estatisticamente significativa a digestibilidade da MS, o que está de acordo com os dados obtidos por Tonel (2009). No entanto Manzanilla *et al.* (2006) concluíram que a adição butirato de sódio à dieta provocou uma menor digestibilidade da MS em todo o TGI. O efeito do butirato apenas atingiu o limiar de significância estatística na digestibilidade da fracção ADF, tendo o regime B:0,25 demonstrado uma melhor performance que o regime B:0,50. Também a retenção de azoto aumentou significativamente no regime B:0,25 e diminuiu no regime B:0,50, sendo que este aumento resultou principalmente dos efeitos aditivos da maior ingestão de azoto e do aumento numérico dos valores de CRN e CUPN.

O CUD da fracção mineral do alimento aumentou do período 1 para o período 2 excepto no grupo B:0,50, no qual diminuiu. Relativamente à fracção fibrosa (NDF e ADF), verifica-se que no período 1 quanto maior o teor de butirato maior o CUD aparente, porém o CUD aparente diminuiu significativamente no período 2 para todas as fracções fibrosas, sendo maior a diminuição quanto maior o teor de butirato na dieta. Porém, apesar desta diminuição do CUD aparente da fracção fibrosa do período 1 para o período 2, na verdade houve um aumento da quantidade de fibra degradada no TGI (Quadro 20), explicado pelo facto de a ingestão de alimento, e consequentemente de fibra, ser superior no período 2 em relação ao período 1. Este aumento na quantidade de fibra digerida justifica-se pela melhor adaptação do TGI dos leitões e sua microflora à utilização de nutrientes de origem vegetal.

Quadro 20 - Variação da quantidade digerida (g/dia) da fracção fibrosa do alimento.

Regime	RC ⁽¹⁾		B:0,25 ⁽¹⁾		B:0,50 ⁽¹⁾	
	1	2	1	2	1	2
NDF digerida/dia	26,09	92,4	24,14	99,04	24,45	76,5
ADF digerida/dia	2,95	7,53	4,19	13,31	3,84	7,02

⁽¹⁾ RC: Regime de Controlo; B:0,25: RC +0,25 % de butirato; B:0,50: RC +0,50 % de butirato.

⁽²⁾ Período 1: leitões 25-29 dias de idade. Período 2: leitões 46-50 dias de idade.

A interacção entre o Regime e o Período foi estatisticamente significativa na digestibilidade da fracção fibrosa do alimento (NDF e ADF), encontrando-se a sua representação gráfica na Figura 8 e 9, respectivamente. Através da sua observação facilmente se constata que o regime B:0,50 é o responsável pela interacção, e que com o passar do tempo este foi o regime mais penalizante para a digestibilidade da fibra. Este modelo de variação está de acordo com a descida da digestibilidade do ADF descrita para este regime. Podemos assim concluir que a ingestão de um regime com 5000 ppm de butirato parece ser penalizante para a utilização digestiva da sua fracção fibrosa.

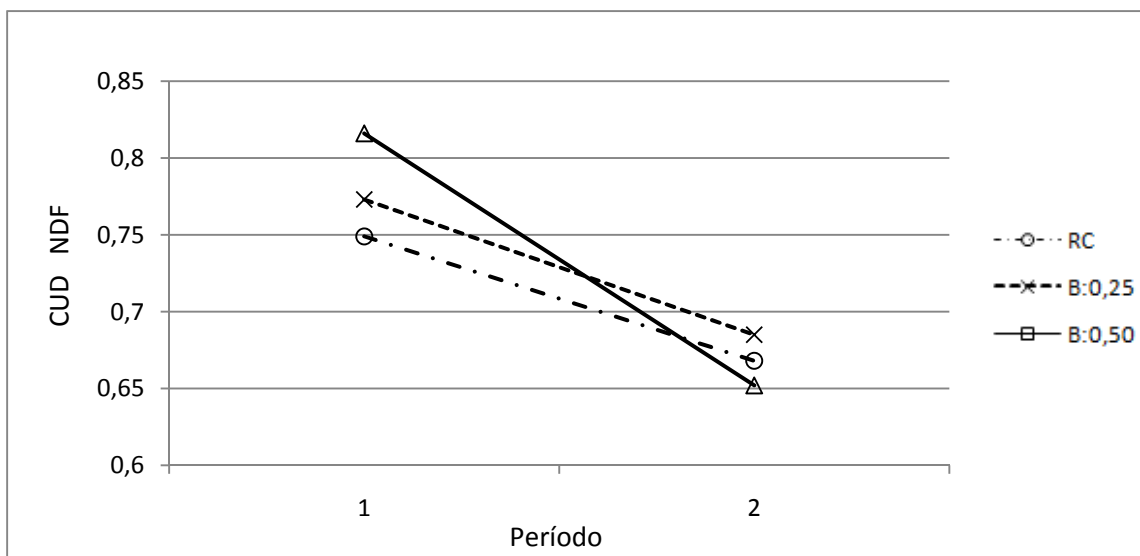


Figura 8 - Gráfico que ilustra a interacção entre o Período e o Regime fornecido sobre o CUD da NDF.

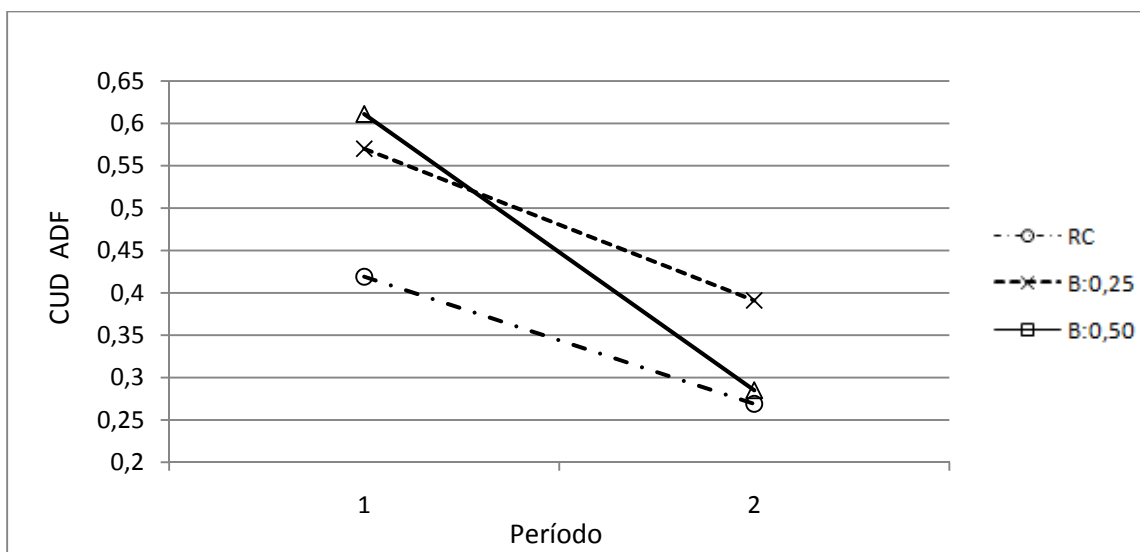


Figura 9 - Gráfico que ilustra a interacção entre o Período e o Regime fornecido sobre o CUD da ADF.

Através da observação da Figura 10 é possível verificar que o efeito significativo da interação Regime x Período sobre a retenção azotada é da responsabilidade do regime B:0,25 (menor valor de retenção azotada no período 1 e maior no período 2). Isto poder-se-á dever a efeitos aditivos de um maior valor numérico de utilização digestiva de PB e também de retenção azotada com este regime, bem como a uma menor produção de ácido isobutírico no íleo e de ácido isovalérico no ceco, o que traduz uma menor degradação microbiana dos compostos azotados e uma consequente melhor utilização da proteína da dieta. Verifica-se assim que a incorporação de 2500 ppm de butirato na dieta foi favorável à retenção de azoto.

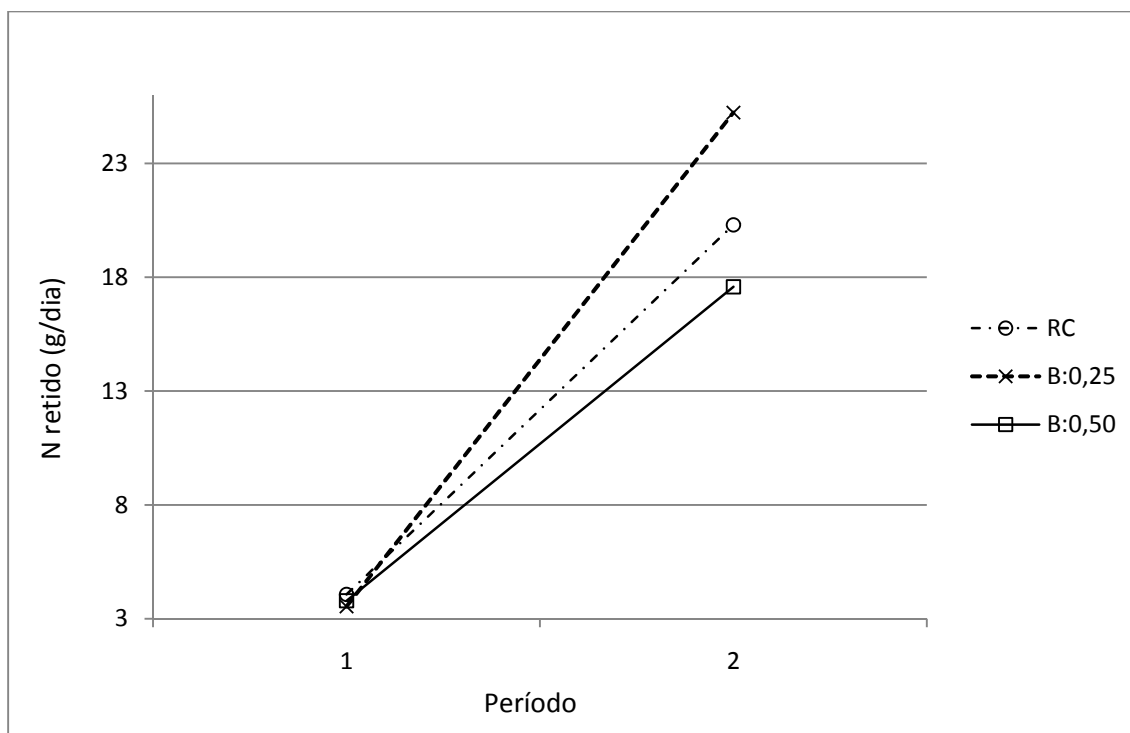


Figura 10 - Gráfico que ilustra a interação entre o Período e o Regime fornecido sobre a retenção azotada.

6. Conclusão

A molécula de butirato utilizada é uma forma complexa que para além de sais de sódio contém sais de potássio e cálcio protegidos por uma matrix de ácidos gordos alimentares. Pretendia-se assim criar uma forma protegida de sais de ácido butírico que não fosse totalmente absorvida nos compartimentos proximais do TGI.

A adição desta forma complexa de butirato à composição da dieta fornecida aos leitões no período do pós-desmame não produziu melhorias significativas nos parâmetros zootécnicos, na digestibilidade e no balanço azotado, à excepção da melhoria na retenção azotada com a utilização de 2500 ppm de butirato. Por outro lado, a utilização do butirato aumentou a produção de AGV no ceco, mas a actividade das enzimas microbianas no ceco e no cólon não sofreu alteração. Não foram observadas alterações na morfologia da parede intestinal.

Não foram observadas alterações na morfologia da parede intestinal, no desenvolvimento do TGI nem actividade enzimática.

Os resultados obtidos neste estudo não permitem confirmar um efeito eficaz da utilização de dois teores de uma forma protegida de butirato na resolução dos problemas digestivos dos leitões na fase de pós-desmame.

Referências Bibliográficas

- BIAGI, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F.X., 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. *J Anim Sci.* 84, 370-378
- BIAGI, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F.X., 2007. Performance, intestinal microflora, and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. *J Anim. Sci.* 85, 1184-1191
- BIKKER, P., Dirkzwager, A., Fledderus, J., Trevisi, P., le Huërou-Luron, I., Lallès, J. P., Awati, A., 2006. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J Anim Sci.* 84, 3337-3345
- BREVES, G., Kock, J. Schröder, B., 2007. Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs. *Livest. Sci.* 109, 4–13
- CANIBE, N., Steien, S.H., Overland, M., Jensen, B.B. 2001. Effect of K-diformate in a starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *J Anim. Sci.* 79, 2123-2133
- 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. *J. Anim. Sci.* 84, 2725-2734
- GÁLFI, P., Bokori, J., 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Vet. Hung.* 38, 3–17
- HEDEMANN, M. S., Eskildsen, M., Lærke, H. N., Pedersen, C., Lindberg, J. E., Laurinen, P., Bach Knudsen, K. E., 2006. Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *J Anim Sci.* 84, 1375-1386
- HEDEMANN, M.S., Dybkjær, L., Jensen, B.B., 2007. Pre-weaning eating activity and morphological parameters in the small and large intestine of piglets. *Livest. Sci.* 108, 128–131
- HERDT, T., 1999. Fisiologia Gastrointestinal y Metabolismo. In: Cunningham, J.D. (Coord.), *Fisiologia Veterinaria*, 2ª ed., México, McGraw-Hill Interamericana Editores, pp. 293-431
- JOUANY, J. P., 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments* 2, 131-144

-
- KOTUNIA, A., Woliński, J., Laubitz, D., Jurkowska, M., Romé, V., Guilloteau, P., Zabielski, R., 2004. Effect of Sodium Butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow. *J Physiol Pharmacol* 55, 59-68
- LÆRKE, H.N., Hedemann, M.S., Bach Knudsen, K.E., Laurinen, P., Lindberg, J.-E., Pedersen C., 2007. Association between butyrate and short-chain fatty acid concentrations in gut contents and faeces in weaning piglets. *Livest. Sci.* 108, 163–166
- LIB, D., Gua, X., 2004. Effect of dietary crude protein level on villous morphology, immune status and histochemistry parameters of digestive tract in weaning piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 113–126
- MANZANILLA, E.G., Nofrarías, 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. *J Anim. Sci.* 84, 2743-2751
- MAZZONI, M., Le Gall, M., De Filippi, S., Minieri, L., Trevisi, P., Wolinski, J., Lalatta-Costerbosa, G., Lallès, J.P., Guilloteau, P., Bosi, P., 2008. Supplemental Sodium Butyrate Stimulates Different Gastric Cells in Weaned Pigs. *J Nutr.* 138, 1426-1431
- MCDONALD, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., 2002. *Animal Nutrition*, 6^a ed., Essex, UK, Pearson Education Limited
- MONTAGNE, L., Pluske, J.R., Hampson, D.J., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108, 95–117
- NOFRARIAS, M., Manzanilla, E.G., Pujols, J., Gibert, X., Majó, N., Segalés, J., Gasa, J., 2007. Spray-dried porcine plasma affects intestinal morphology and immune cell subsets of weaned pigs. *Livest. Sci.* 108, 299–302
- NRC, 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10^a ed., Washington D.C., USA, National Academy Press
- PARTANEN, K.H., Mroz, Z., 1999. Organic acids performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews* 12, 1-30
- PIVA, A., Morlacchini, M., Casadei, G., Gatta, P.P., Biagi, G., Prandini A., 2002. Sodium butyrate improves growth performance of weaned piglets during the first period after weaning. *Ital. J. Anim. Sci.*, volume 1, 35-41
-

- 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. *Livest. Prod. Sci.* 74, 191–202
- TONEL, I.S.P.A., 2009. Efeito da utilização de Butirato de Sódio na digestibilidade, actividade fermentativa e morfologia intestinal de leitões desmamados. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, Lisboa
- VAN BEERS-SCHREURS, H.M.G., Nabuurs, M.J.A., Vellenga, L., Kalsbeek-van der Valk, H.J., Wensing T., Breukink, H.J., 1998. Weaning and the Weanling Diet Influence the Villous Height and Crypt Depth in the Small Intestine of Pigs and Alter the Concentrations of Short-Chain Fatty Acids in the Large Intestine and Blood. *J. Nutr.* 128, 947–953
- VENTE-SPREEUWENBERG, M.A.M., Verdonk, J.M.A.J., Bakker, G.C.M., Beynen, A.C., Verstegen, M.W.A., 2004. Effect of dietary protein source on feed intake and small intestinal morphology in newly weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.* 86, 169–177
- VERDONK, J.M.A.J., Bruininx, E.M.A.M., van der Meulen, J., Verstegen, M.W.A., 2007. Post-weaning feed intake level modulates gut morphology but not gut permeability in weaned piglets. *Livest. Sci.* 108, 146–149
- WANG, Y.-Z., Shan, T.-Z., Xu, Z.-R., Feng, J., Wang, Z.-Q., 2007. Effects of the lactoferrin (LF) on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 263–272
- WEBER, T.E., Kerr, B.J., 2008. Effect of sodium butyrate on growth performance and response to lipopolysaccharide in weanling pigs. *J Anim. Sci.* 86, 442-450