



O BUTIRATO DE SÓDIO NA ALIMENTAÇÃO DO COELHO EM CRESCIMENTO-ENGORDA

Joana de Oliveira Ribeiro

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

Orientador: Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha

Co-Orientador: Doutor Mário António Soares de Pinho

Jurí:

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

Vogais: Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Arminda da Conceição Coutinho Martins Bruno Soares, Investigadora Principal do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Mário António Soares de Pinho, Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2009

Resumo

Estudou-se o efeito da adição de Butirato de Sódio (BS) nos regimes alimentares de coelhos em crescimento-engorda, assim como no período pós-desmame. Para tal, realizaram-se dois ensaios, que permitiram determinar o efeito sobre os resultados zootécnicos, a digestibilidade das dietas, a fermentação cecal, o desenvolvimento do tracto digestivo e a morfologia intestinal. No Ensaio Zootécnico utilizaram-se 180 coelhos de 23 dias, que foram distribuídos por dois regimes, um sem (regime Controlo – CTR) e um com BS. A dose adicionada de BS foi de 5g/kg durante as primeiras 2 semanas pós-desmame e depois de 3g/kg. O segundo ensaio foi realizado simultaneamente, com 15x2 animais, ingerindo os mesmos regimes, mas os coelhos foram abatidos ao fim de 2 semanas.

A adição de BS melhorou o Índice de Conversão (2,30 CTR vs 2,23 BS) devido à diminuição da ingestão de alimento ($P < 0,015$). Não se observaram efeitos desta suplementação nem na digestibilidade, na produção de ácidos gordos voláteis, registando-se um aumento na actividade da pectinase no conteúdo cecal. Verificou-se um aumento significativo da profundidade das criptas no duodeno, jejuno e íleo e da relação altura das vilosidades/profundidade das criptas nos dois últimos segmentos do intestino delgado foi significativamente inferior com o regime BS.

Palavras Chave: coelho, butirato de sódio, morfologia intestinal, resultados zootécnicos, fermentação cecal.

Abstract

We studied the effect of the addition of sodium butyrate (SB) in diets of growing-fattening rabbits, as well as in the post-weaning period. To this end, there were two trials, which allowed us to determine the effect on the zootechnical performances, the digestibility of diets, cecal fermentation, the development of the digestive tract and intestinal morphology. In Zootechnics Trial were used 180 rabbits with 23 days, which were allocated to two diets, one without (Control diet - CTR) and one with SB. The dose of SB added was 5 g/kg during the first 2 weeks after weaning and then changed to 3g/kg. The second test was conducted simultaneously with 15x2 animals, eating the same schemes, but the rabbits were slaughtered after 2 weeks.

The addition of SB improved conversion rate (2.30 CTR vs. 2.23 BS) due to decreased food intake ($P < 0.015$). There were no effects of supplementation on digestibility, or in the production of volatile fatty acids, registering an increase in the activity of pectinase in the cecal contents. There was a significant increase in crypt depth in duodenum, jejunum and ileum and the ratio of villous height / crypt depth in the last two segments of the small intestine was significantly lower in the BS diet.

Keywords: rabbit, sodium butyrate, intestinal morphology, zootechnical results, cecal fermentation.

Extended Abstract

The period after weaning is very important because it is especially in this time of growth that the digestive diseases occur in the animal (Scapinello *et al.*, 2001; Briens *et al.*, 2005; Struklec and Maertens, 2006). To prevent this happening for decades were used antibiotics, but the emergence of multi-resistant bacteria has led to their total banishment in the EU in January of 2006 (Aarestrup, 2002; Casewell *et al.*, 2003). As a result, there was a greater interest in the development of potential alternatives that could be used as substitutes for antibiotic growth promoters (AGP), including, organic acids that appear to be one of the most promising, which has been given greater attention, because of the positive results already obtained (Partanen and Mroz, 1999; Øverland *et al.*, 2007; Viola *et al.*, 2007). The butyric acid or butyrate has been studied to a lesser extent although it is an important nutrient and trophic factor of the intestinal epithelium (Partanen and Mroz, 1990; Knudsen *et al.*, 2003).

To better understand its effect we studied the addition of sodium butyrate (SB) on growth and fattening of rabbits, as well as in the post-weaning. To this end, there were two trials which allowed us to determine the effect on the zootechnical performances, the digestibility of the diets, cecal fermentation, the development of the digestive tract and intestinal morphology. In Zootechnics Trial were used 180 rabbits from 23 days to 63 days, which were allocated to two diets, one without (Control Diet - CTR) and one with SB. The dose of SB was added to 5 g/kg during the first 2 weeks after weaning and after 3g/kg. The second trial was conducted simultaneously with 15x2 animals, eating the same diets, but where the rabbits were killed after 2 weeks.

In the first two weeks average daily gain (ADG) (40.1 vs. 37.0 g / d) and feed intake (FI) (63.9 vs. 57.2g / d) were significantly higher with the CTR diet than with the BS diet, although the conversion rate (CR) was lower in the second diet. For the whole period, no significant differences were obtained in ADG (44.0 vs. 44.8 g / d) between the two regimes and the CR was significantly more favorable with BS (2.30 CTR vs. 2.23 BS) due to higher daily weight increase observed in animals fed with SB diet during the last weeks of testing and a decrease in food intake ($P < 0.015$). In Trial of Post-weaning growth, although the recorded results in CTR animals were higher than in the BS ($P=NS$) diet there was a better CR, as in the Zootechnics Trial (1.53 CTR vs. 1.51 BS).

There were no effects of supplementation on digestibility of nutrients, or in the production of volatile fatty acids, registering an increase in the activity of Pectinase (64.4 CTR vs. 75.9 BS). There was also a decrease in liver weight (65.7 g CTR vs. 53.5 g BS), but

there were no significant differences in the pH of stomach and cecum contents. In the intestinal mucosa there was a significant increase in crypt depth (87.2 μm , 91.6 μm , 87.9 μm in the diet CTR vs. 113.1 μm , 130.1 μm , 112.8 μm in the BS diet, in the duodenum, jejunum and ileum, respectively) and the ratio of villous height / crypt depth was significantly lower ($P < 0.05$) with the BS diet in the last two segments of the small intestine. We also observed the presence of coccidia in the small intestine being significant in the ileum (1.64 CTR vs. 7.12 BS).

Keywords: rabbit, sodium butyrate, intestinal morphology, zootechnical results, cecal fermentation.

Agradecimentos

À Professora Doutora Luísa Falcão e Cunha, minha orientadora, por todo o apoio, paciência e amizade demonstrados durante a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Pinho, por ter aceite a co-orientação deste trabalho e, por todo o apoio ao longo da elaboração do mesmo.

À empresa Tecadi pela colaboração neste projecto.

A todos os docentes do Instituto Superior de Agronomia que contribuíram para minha formação, em particular os do Departamento de Produção Animal.

Ao Sr. José António pela preciosa ajuda, paciência e simpatia demonstrada na parte experimental do trabalho.

À D. Lígia, D. Cesaltina e D.Lourdes pelo apoio e companhia prestados nas etapas laboratoriais deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e restante família por todo o amor a paciência durante toda a realização e elaboração desta tese.

À Sandra pela preciosa amizade e ajuda durante todo o ensaio e depois dele.

À Andreia, Catarina, Sara, Marta, Renata, Duarte, Mário Coelho, Mário Reis, João, Ticha, Luís, Anabela e todos os meus restantes amigos, pela amizade, paciência, apoio e importante auxílio em algumas etapas deste trabalho.

A todos, o meu Muito Obrigada!

Índice Geral

I. Introdução e Objectivos.....	Pág. 1
II. Revisão Bibliográfica.....	Pág. 3
1. O Coelho.....	Pág. 3
1.1 Particularidades da Produção Cunicula.....	Pág. 3
1.2 Particularidades do tracto gastrointestinal do coelho.....	Pág. 4
1.3 Morfologia do Intestino Delgado.....	Pág. 6
1.4 Flora Microbiana no tracto digestivo.....	Pág. 9
1.5 Actividade Enzimática Microbiana.....	Pág. 10
1.6 Fermentação Cecal.....	Pág. 11
2. Os Ácidos Orgânicos na Alimentação Animal.....	Pág. 12
2.1 Utilização dos Ácidos Orgânicos.....	Pág. 13
2.2 Modo de acção dos Ácidos Orgânicos.....	Pág. 14
2.3 O que afecta a acção dos Ácidos Orgânicos.....	Pág. 15
2.3.1 A Capacidade Tampão.....	Pág. 16
2.3.2 Outros factores.....	Pág. 16
2.4 Acção dos Ácidos Orgânicos.....	Pág. 17
2.5 Efeitos dos Ácidos Orgânicos na mucosa intestinal.....	Pág. 18
2.6 Efeitos dos Ácidos Orgânicos no tracto digestivo.....	Pág. 20
3. O Ácido Butírico ou Butirato.....	Pág. 20
3.1 O Butirato de Sódio.....	Pág. 21
III. Materiais e Métodos.....	Pág. 28
1. Ensaio Zootécnico.....	Pág. 28
2. Regimes Alimentares.....	Pág. 28

3. Ensaio Pós-Desmame.....	Pág. 30
4. Análises.....	Pág. 31
4.1 Determinação da Matéria Seca, Matéria Orgânica e Cinza.....	Pág. 31
4.2 Determinação da Fibra.....	Pág. 32
4.3 Determinação da Proteína Bruta.....	Pág. 32
4.4 Determinação da Energia.....	Pág. 32
4.5 Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis.....	Pág. 32
4.6 Determinação da Actividade Enzimática.....	Pág. 32
4.7 Determinação do pH.....	Pág. 33
4.8 Determinação da Capacidade Tampão dos regimes.....	Pág. 33
4.10 Análise das mucosas intestinais.....	Pág. 34
4.10.1 Contagem de Coccidias.....	Pág. 34
5. Parâmetros Estudados.....	Pág. 34
6. Análise Estatística.....	Pág. 35
IV. Resultados e Discussão.....	Pág. 36
1. Ensaio de Crescimento.....	Pág. 36
2. Digestibilidade Fecal Aparente.....	Pág. 39
3. Actividade Microbiana Cecal.....	Pág. 41
3.1 pH dos conteúdos e Capacidade Tampão.....	Pág. 41
3.2 Concentração dos Ácidos Gordos Voláteis.....	Pág. 43
3.3 Actividade Fermentativa.....	Pág. 45
4. Resultados do Abate.....	Pág. 46
5. Análise das mucosas intestinais.....	Pág. 47
5.1 Contagem de Coccidias.....	Pág. 50
V. Conclusão.....	Pág. 52
Referências Bibliográficas.....	Pág. 53

Índice de Quadros

Quadro 1 - Síntese de dados publicados dos efeitos da suplementação com Butirato de Sódio na performance de suínos, coelhos e vitelos.....	Pág. 24
Quadro 2 - Composição das dietas (% alimento) e correspondente Composição Química.....	Pág. 29
Quadro 2.1 - Composição do Complexo Mineral e Vitamínico por kg de alimento.....	Pág. 30
Quadro 3 - Efeito do Butirato de Sódio no crescimento e performance de coelhos.....	Pág. 38
Quadro 4 - Efeito da adição do Butirato de Sódio no crescimento e performance de coelho noEnsaio de Pós-desmame.....	Pág. 38
Quadro 5 - Efeito da adição do Butirato de Sódio na digestibilidade fecal aparente (%)......	Pág. 40
Quadro 6 - Efeito da adição de Butirato de Sódio no pH do estômago e ceco.....	Pág. 42
Quadro 7 - Efeito da adição de Butirato de Sódio na Capacidade Tampão da dieta (mEq/kg de alimento).....	Pág. 43
Quadro 8 - Efeito da adição de Butirato de Sódio na concentração dos Ácidos Gordos Voláteis (AGV) no ceco.....	Pág. 44
Quadro 9 - Efeito da adição de Butirato de Sódio na actividade total das enzimas digestivas microbianas (mg/h/g conteúdo cecal na MS).....	Pág. 45
Quadro 10 - Efeito da adição do Butirato de Sódio na carcaça e no desenvolvimento do aparelho digestivo do coelho (g) e em proporção com o PV do animal (g / kg de PV).....	Pág. 47

Quadro 11 - Efeito do Butirato de Sódio na morfologia intestinal.....	Pág. 49
Quadro 12 - Efeito da adição do Butirato de Sódio na proliferação de Coccidias.....	Pág. 51

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do sistema digestivo do coelho – Valores numéricos para um coelho de 2,4 kg (Falcão e Cunha, 2000, adaptado de Lebas, 1978).....	Pág. 5
Figura 2 - Corte histológico do jejuno (objectiva de 4x) que permite a observação das diferentes camadas presentes no intestino delgado, utilização do microscópio Olympus BX 511.....	Pág. 7
Figura 3 - Corte histológico duodeno (objectiva de 10x) que permite a observação da composição das vilosidades intestinais, utilização do microscópio Olympus BX 511.....	Pág. 8
Figura 4 - Modo de acção dos ácidos orgânicos em bactérias sensíveis aos gradientes de pH (Exemplo: <i>E.coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Listeria sp.</i> , entre outras) (Gauthier, 2002, adaptado de Piva A., Universidade de Bolonha, Itália)....	Pág. 15
Figura 5 - Esquema representativo das actividades realizadas no decorrer do Ensaio Zootécnico.....	Pág. 28
Figura 6 - Esquema representativo das actividades realizadas no decorrer do Ensaio Pós-Desmame.....	Pág. 31
Figura 7 - Corte histológico do duodeno (objectiva de 4x) que permite a observação das coccidias presentes no intestino delgado de um animal do regime BS, utilização do microscópio Olympus BX 511.....	Pág. 51

Índice de Gráficos

- Gráfico 1** - Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na altura das vilosidades do Duodeno. Ensaios realizados em suínos (Kotunia *et al.*, 2004; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009)..... Pág.25
- Gráfico 2** - Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na profundidade das criptas do Duodeno. Ensaios realizados em suínos (Kotunia *et al.*, 2004; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009)..... Pág. 25
- Gráfico 3** - Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na altura das vilosidades do Jejuno. Ensaios realizados em suínos (Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009)..... Pág. 26
- Gáfico 4** - Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na profundidade das criptas do Jejuno. Ensaios realizados em suínos (Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009)..... Pág. 26
- Gráfico 5** - Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na altura das vilosidades do Íleo. Ensaios realizados em suíno(Gálfi e Bokori, 1990;Kotunia *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009), coelhos (Carraro *et al.*, 2005) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009)..... Pág. 27
- Gráfico 6** - Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na profundidade das criptas do Duodeno. Ensaios realizados em suínos (Gálfi e Bokori, 1990; Kotunia *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009), coelhos (Carraro *et al.*, 2005) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009)..... Pág. 27

Lista de Abreviaturas

ADF – Fibra Ácido-Detergente

ADL – Lenhina Ácido-Detergente

AGP – Antibiotics Growth Promoters (Antibióticos Promotores de Crescimento)

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

AP – aumento de peso

BS – Butirato de Sódio

C2 – acetato

C3 – propionato

C4 – butirato

CEL – Celulose

cm – centímetro

CT – capacidade tampão

CTR – Controlo

CUD – Coeficiente de Utilização Digestiva

d – dia

E. coli – *Escherichia coli*

FB – Fibra Bruta

g – grama

GB – Gordura Bruta

GMD – Ganho Médio Diário

h – hora

HCl – ácido clorídrico

HEM – hemicelulose

IC – Índice de Conversão

ISA – Instituto Superior de Agronomia

Kcal – quilocalorias

kg – quilograma

L – Litro

m – metro

mEq – miliequivalentes

mg – miligramas

ml – mililitro

mm – milímetro

mmol – mili mol

MO – Matéria Orgânica

mol – mol

MS – matéria seca

N – normais

NDF – Fibra Neutro-Detergente

nm – nanómetro

PB – Proteína Bruta

PI – Peso Inicial

PF – Peso Final

PV – Peso Vivo

QI – Quantidade Ingerida

Rpm – rotações por minuto

SCFA – Short-Chain Fatty Acids (Ácidos Gordos de Cadeia Curta)

UE – União Europeia

UI – Unidades Internacionais

V:C – Relação altura das vilosidades:profundidade das criptas

µl – microlitro

µm – micrómetros

I. Introdução e Objectivos

A produção animal tem-se vindo a adaptar às crescentes exigências e técnicas de um sector agro-industrial extremamente competitivo e a um mercado consumidor cada vez mais rigoroso com a qualidade dos produtos. Neste sentido, é cada vez mais intensa a preocupação com as condições sob as quais os animais são criados e nomeadamente nas implicações que isso pode acarretar para a qualidade do produto final (Michelan *et al.*, 2002).

A cunicultura é um ramo da produção animal que para ser uma actividade rentável necessita que seja reduzido o custo de alimentação e diminuída a mortalidade, especialmente nos coelhos até aos 50 dias de idade (Gippert *et al.*, 1996; Srikanová e Marounek, 2002). Estes dois factores estão interligados, pois um dos principais problemas na produção desta espécie é a sua nutrição, isto é, fornecer nutrientes de forma a obter um crescimento óptimo, mas ao mesmo tempo evitar as desordens digestivas provocadas por um fornecimento inadequado de nutrientes. Assim, o ideal será obter uma relação óptima entre a concentração energética e o nível de fibra, que são os factores que mais afectam a alimentação destes animais, pois normalmente, alimentos compostos com elevadas concentrações energéticas possuem baixos níveis de fibra o que pode ser prejudicial (De Blas *et al.*, 1986; Gidenne, 1997). A ocorrência de doenças digestivas, devido aos factores em cima referidos, principalmente logo após o desmame, é a maior causa de perdas económicas numa exploração comercial desta espécie. Actualmente, a gravidade do problema é demonstrada pela existência de uma taxa de mortalidade que pode ultrapassar 18-20% (Scapinello *et al.*, 2001; Briens *et al.*, 2005; Maertens e Struklec, 2006).

Há quase meio século, desde a descoberta e desenvolvimento dos primeiros antibióticos, que estes têm vindo a ser utilizados na alimentação animal de forma a promover uma melhor eficácia no crescimento (Jukes, 1977; Khachatourians, 1998). A utilização destas substâncias permitiu uma produção mais rentável em suínos, pois verificou-se uma melhoria do índice de conversão e do ganho médio diário que variou entre 2,5% - 7,0% e entre 3,3% - 8,8% respectivamente (Viaene e Verbeke, 1999). Apesar da melhoria de resultados, em 1986, após se verificar um aumento no aparecimento de bactérias gram-positivas multi-resistentes, a Suécia baniu o uso de antibióticos promotores de crescimento; seguindo-se a Dinamarca que proibiu o uso da avoparcina e da virginamicina em 1995 e 1998, respectivamente; em 1997 a UE proibiu o uso dos primeiros antibióticos promotores de crescimento (virginamicina, espiramicina, fosfato de tilosina e

bacitracina de zinco). Por trás desta banição esteve, tal com já foi referido anteriormente, a preocupação não só política seguindo as exigências do consumidor mas também da comunidade científica, que esta resistência que se verificava nos animais se pudesse propagar para o ser humano prejudicando a saúde do mesmo. (NRC, 1980; Doyle, 2001; Aarestrup, 2002; Casewell *et al.*, 2003).

Como tal, em Janeiro de 2006 a União Europeia proibiu o uso de qualquer antibiótico como promotor de crescimento em alimentos para animais destinados ao consumo humano (CE, 2003; Øverland *et al.*, 2007; Øverland *et al.*, 2008).

Esta proibição tem colocado um grande desafio aos produtores de carne de coelho, devido ao peculiar e complexo processo digestivo destes animais (como a prática de cecotrofia e a fermentação microbiana), pois esta espécie é susceptível a desequilíbrios digestivos. Estes podem causar diarreias que estão, temporalmente relacionadas com o período após o desmame, sendo essa a maior causa da sua mortalidade (Srikanová e Marounek, 2002; Eiben *et al.*, 2008).

Após a proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento (AGP) como forma de controlo das infecções entéricas surgiu uma pressão cada vez maior de encontrar substâncias alternativas aos antibióticos promotores de crescimento, substâncias essas que permitam obter resultados semelhantes aos dos antibióticos, que não criem resistências e que se adequem à produção cunícola dos dias de hoje (Knarreborg *et al.*, 2002; Srikanová e Marounek, 2002; Diebold e Eidelsburger, 2006; Eiben *et al.*, 2008). Entre as alternativas estudadas, os ácidos orgânicos surgem como uma das mais promissoras, à qual tem sido dada maior atenção, por já se terem obtido resultados positivos (Partanen e Mroz, 1999; Øverland *et al.*, 2007; Viola *et al.*, 2007). Contudo, a maioria da informação disponível sobre acidificantes na alimentação animal está focada em suínos (Giesting e Easter, 1985; Radecki *et al.*, 1988; Ravindraw e Kornegay, 1993) e aves, sendo a informação relativa a coelhos muito escassa (Hullar *et al.*, 1996; Carraro *et al.*, 2005; Falcão-e-Cunha *et al.*, 2007).

De forma a tornar mais completa a informação disponível sobre a utilização de ácidos orgânicos, este trabalho teve como objectivo estudar o efeito que a adição na dieta de Butirato de Sódio (BS) provoca no desempenho zootécnico, na mucosa intestinal e na actividade fermentativa de coelhos em crescimento-engorda.

II. Revisão Bibliográfica

1. O Coelho

Os coelhos são mamíferos da ordem dos lagomorfos da família dos leporídeos, em que os géneros mais representativos são o *Oryctolagus* e o *Sylvilagus*, sendo a espécie mais comum a *Oryctolagus cuniculus*, ou coelho-europeu. Ao longo dos séculos, devido ao pequeno porte e grande capacidade de reprodução desta espécie foram, inicialmente, criados em pequena escala para consumo próprio enquanto actualmente o fazem em produção intensiva. Este aumento da produção levou à ocorrência de uma selecção dos animais, tendo como alvo a criação e estabilização das cores do coelho, surgindo assim os primeiros animais denominados “híbridos”, que são o cruzamento entre raças ou estirpes, todas pertencentes à espécie *Oryctolagus cuniculus* (Lebas, 2007).

1.1 Particularidades da Produção Cunícola

A produção de coelhos é um importante ramo da produção animal que se encontra disperso por todo o mundo, tendo sido principalmente desenvolvido na orla mediterrânica e nos países da América Latina. A carne de coelho é de elevada segurança e qualidade, no entanto, a susceptibilidade dos láparos a doenças infecciosas e de alta mortalidade, prejudica o desenvolvimento da produção cunícola e pode levar a perdas económicas significativas (Srikanová e Marounek, 2002; Kermauner *et al.*, 1996).

Os coelhos em produção intensiva são mais vulneráveis a perturbações digestivas, podendo estar relacionado com diversos factores, como por exemplo, com a maturação dos processos digestivos, as mudanças de hábitos alimentares, o aumento do consumo de alimentos sólidos, as características nutricionais das rações e as disbioses microbianas no ceco (Laplace, 1978; Kermauner *et al.*, 1996; Gidenne, 1997). Perante tais condições, podem desenvolver-se fermentações microbianas irregulares, assim como, a proliferação de microrganismos potencialmente patogénicos, podendo dar origem a desordens digestivas (Kermauner *et al.*, 1996). Durante décadas, foram utilizados os AGP como forma de evitar tais perdas, no entanto, a preocupação com a saúde humana tornou necessária a procura de novos aditivos alimentares para substituí-los. Assim, surgiu então o interesse no desenvolvimento e utilização dos probióticos, dos ácidos orgânicos, dos prébióticos, das enzimas e de outras substâncias. Estas actuam, de modo a controlar a proliferação de

microrganismos patogénicos, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos desejáveis e/ou actuando sobre o pH do tracto digestivo. A adição destas substâncias vai assim, diminuir os distúrbios gastrointestinais e melhorar o aproveitamento dos nutrientes e desempenho dos animais (De Blas, 1984; Fuller, 1989; Kermauner e Strucklec, 1996).

Estudos têm sido efectuados sobre os efeitos da utilização de ácidos orgânicos ou dos seus sais, na saúde e desempenho produtivo, levando à sua incorporação nas dietas da produção intensiva de coelhos (Zi Lin *et al.*, 1996; Hullar *et al.*, 1996; Scapinello *et al.*, 2001; Abecia *et al.*, 2005).

Considerando que a acção destas substâncias se realiza essencialmente ao nível do aparelho digestivo torna-se pertinente conhecer as principais características do seu tracto gastrointestinal.

1.2 Particularidades do tracto gastrointestinal do coelho

O coelho é um animal monogástrico, herbívoro que está adaptado ao consumo de alimentos fibrosos, devido à presença de microrganismos no seu tracto digestivo e pela prática de cecotrofia (Falcão e Cunha, 2000; Pinheiro e Mourão, 2006).

Assim, anatomicamente, os coelhos apresentam um aparelho digestivo caracterizado por um estômago glandular simples, um tracto intestinal longo e um ceco muito desenvolvido. O ceco no coelho é funcional e é responsável por promover a proliferação microbiana pelo processo de formação das fezes duras, o que permite o retrocesso das partículas mais pequenas ao ceco onde vão sofrer uma fermentação adicional (Falcão e Cunha, 2000; Amorim *et al.*, 2002).

O aparelho digestivo do coelho (Figura 1) reflecte a sua alimentação natural (Falcão e Cunha, 2000), desenvolvendo-se rapidamente. Quando os animais atingem 2,5 kg ou cerca de 60 a 70% do peso em adultos, o tubo digestivo possui o seu tamanho final que varia entre 4,5 a 5 metros (Lebas *et al.*, 1996).

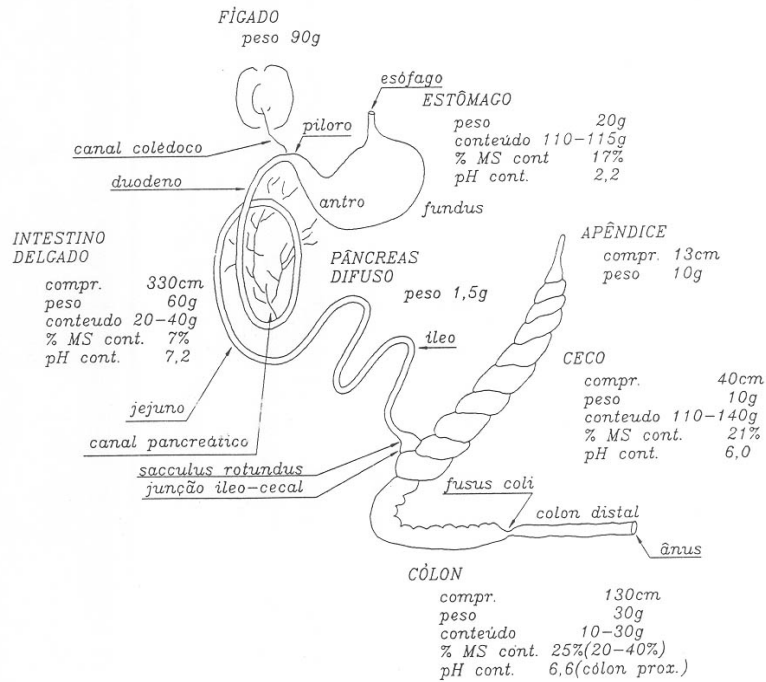


Figura 1. Representação esquemática do sistema digestivo do coelho – valores numéricos para um coelho de 2,4 kg (Falcão e Cunha, 2000, adaptado de Lebas, 1978).

O tubo digestivo inicia-se na boca, seguindo-se um curto esôfago que precede um estômago simples e volumoso que armazena cerca de 90 a 100 g de uma mistura pouco pastosa de alimentos (Lebas *et al.*, 1996), onde o pH pode variar entre 1 e 5, predominando os valores entre 1 e 2, dependendo este do local de determinação, da presença ou não de cecotrofos, do tempo decorrido após a ingestão de alimento e da idade do animal (Pinheiro e Mourão, 2006). O estômago, com exceção das cárdias, apresenta uma musculatura pouco desenvolvida, pelo que os seus movimentos são bastante limitados. No entanto, há uma secreção contínua de ácido clorídrico (HCl) e pepsinogénio que vão facilitar a digestão dos alimentos (Pinheiro e Mourão, 2006).

Ao estômago segue-se o intestino delgado que tem aproximadamente 3 m de comprimento e 0,8 a 1 cm de diâmetro. Este órgão é composto por três segmentos, o duodeno, o jejuno e o íleo, tendo o seu conteúdo um pH próximo da neutralidade. É também aqui o local terminal de digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina sendo essa a razão pela qual o seu conteúdo é líquido e as suas paredes são finas e muito vascularizadas. O intestino delgado termina no Ceco (Pinheiro e Mourão, 2006; Junqueira e Carneiro, 2004). O fígado e o pâncreas são as duas principais glândulas secretoras para o intestino delgado (Lebas *et al.*, 1996).

O ceco é um compartimento que tem em média 40 a 45 cm de comprimento e um diâmetro de 3 a 4 cm, assemelhando-se a uma bolsa que se ramifica para o exterior entre o intestino delgado e o cólon (Lebas *et al.*, 1996). Tem um papel chave na fisiologia digestiva, pois além de ser o principal local de fermentação, representa 40% do tracto digestivo (Parker, 1976; Marty e Vernay, 1984). Este recebe os resíduos alimentares e os produtos endógenos de excreção que não foram digeridos no intestino delgado e são aí fermentados dando origem aos ácidos gordos voláteis (AGV) e à síntese de materiais microbianos, como as proteínas e as vitaminas do complexo B (Pinheiro e Mourão, 2006).

O pH do conteúdo cecal, pode assim ajudar a caracterizar esta fermentação, dado que reflecte a produção dos AGV. O seu valor depende da idade dos animais e varia, normalmente, entre 5,5 e 6,5. Em coelhos adultos a produção de AGV assume alguma importância, uma vez que, a absorção destes pode representar 30% do metabolismo basal (Parker, 1976; Marty e Vernay, 1984). Assim, a população microbiana no ceco dos coelhos contribui como uma importante extensão do tracto digestivo e da utilização de nutrientes (Abecia *et al.*, 2005).

No intestino grosso, o órgão que se segue ao ceco, o cólon tem aproximadamente 1,5 m e divide-se em duas partes o cólon proximal e o cólon distal. O primeiro tem cerca de 35 a 50 cm, apresenta dobras e é onde ocorre a produção de muco. O segundo é liso, com cerca de 80 a 100 cm de comprimento e é responsável por grande parte de absorção de água e minerais (Lebas *et al.*, 1996; Pinheiro e Mourão, 2006). Mais à frente, no capítulo 2.6 serão abordados os efeitos provocados no aparelho digestivo dos animais pela adição de ácidos orgânicos.

1.3 Morfologia do Intestino Delgado

O intestino delgado tem um importante papel na defesa contra agressões antigénicas em coelhos jovens (Gallois *et al.*, 2005). Além disso, para que as dietas sejam devidamente digeridas e absorvidas a mucosa intestinal deve apresentar características estruturais e morfofisiológicas adequadas (Maiorka, 2006), por isso se torna fundamental conhecer e estudar os efeitos que o regime alimentar e/ou alguns dos seus componentes podem exercer na sua morfologia.

A mucosa do intestino delgado apresenta várias estruturas que aumentam a sua superfície de absorção denominadas vilosidades intestinais ou vilos, que se podem observar nas Figuras 2 e 3. Estas são projecções alongadas da mucosa (epitélio e lâmina própria) em

direcção ao lúmen do intestino delgado com cerca de 0,5 – 1,5 mm de comprimento. No duodeno possuem a forma de folhas, assumindo gradualmente a forma de dedos à medida que se aproximam do íleo. Entre os vilos existem pequenas aberturas tubulares simples denominadas glândulas intestinais (também chamadas de criptas), ou glândulas de Lieberkühn (Junqueira e Carneiro, 2004).

É nestas aberturas tubulares que ocorre a actividade mitótica das células estaminais, migrando depois os enterócitos deste local até ao ápice da vilosidade, onde ocorre a apoptose destas células, este é o processo de maturação dos enterócitos que constituem as vilosidades (Claus *et al.*, 2007; Maiorka, 2006).

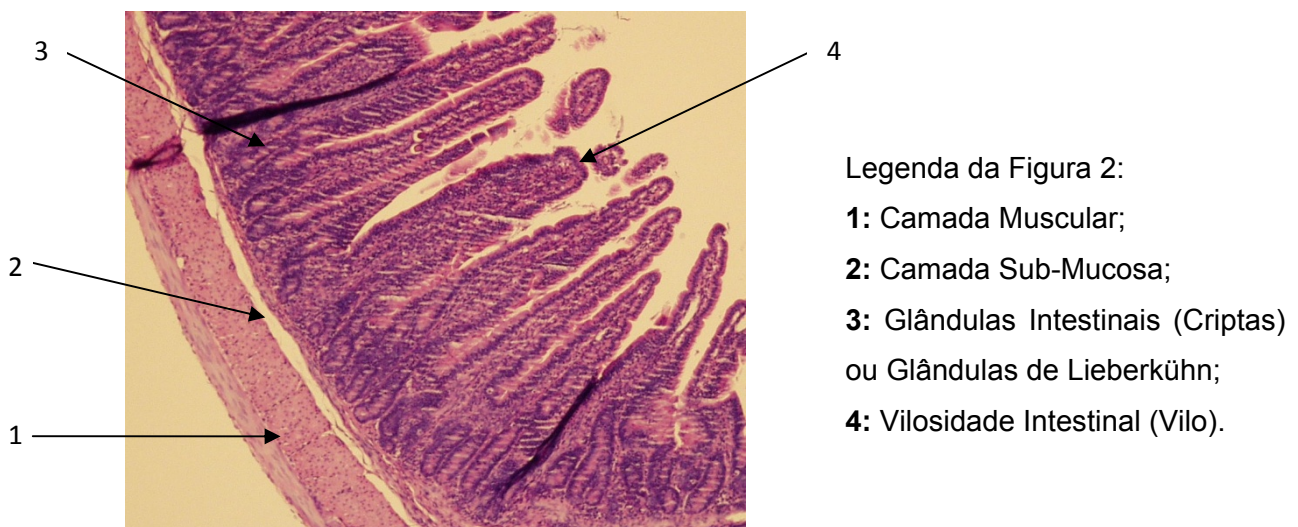
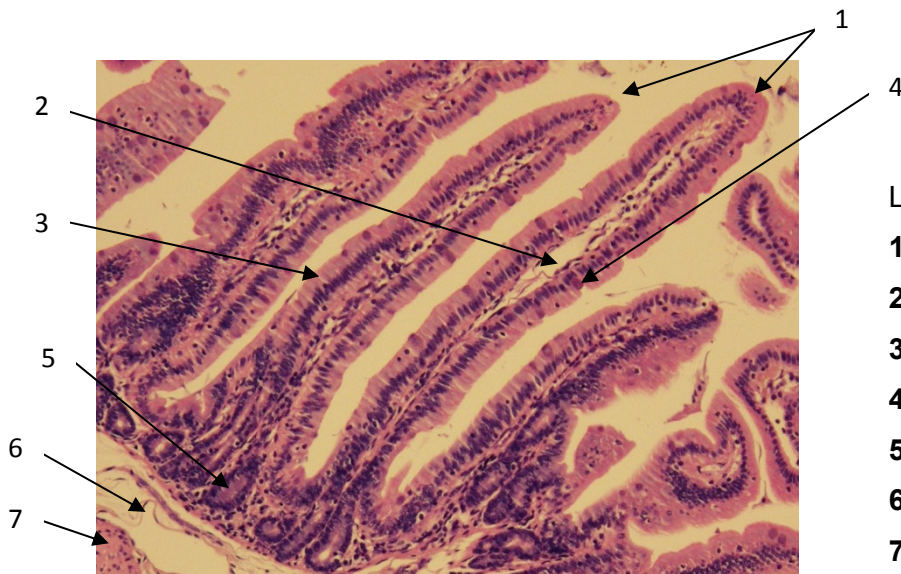


Figura 2. Corte histológico do jejuno (objectiva de 4x) que permite a observação das diferentes camadas presentes no intestino delgado, utilização do microscópio Olympus BX 511.



Legenda da Figura 3:

- 1: Vilosidade Intestinal (Vilo);
- 2: Lâmina Própria;
- 3: Enterócitos;
- 4: Célula Caliciforme;
- 5: Glândula Intestinal (Cripta);
- 6: Sub-Mucosa;
- 7: Muscular da mucosa.

Figura 3. Corte histológico duodeno (objectiva de 10x) que permite a observação da composição das vilosidades intestinais, utilização do microscópio Olympus BX 511.

Existem ainda as células caliciformes (Figura 3) que são as células responsáveis pela produção de glicoproteínas ácidas do tipo mucina, glicoproteínas estas que são hidratadas e formam ligações entre si para originar o muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento do intestino (Junqueira e Carneiro, 2004).

A preencher o centro das vilosidades intestinais temos a lâmina própria (Figura 3). Esta é composta por tecido conjuntivo laxo com vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e fibras musculares lisas. Estas últimas encontram-se dispostas verticalmente entre a muscular da mucosa e a ponta das vilosidades, sendo responsáveis pelos movimentos rítmicos destas, que constitui uma acção importante para a absorção dos nutrientes. A camada muscular da mucosa não apresenta qualquer peculiaridade neste órgão, mas é bem desenvolvida e é composta de uma camada circular interna e outra longitudinal externa (Junqueira e Carneiro, 2004).

Assim os efeitos que a adição de ácidos orgânicos poderá provocar no intestino delgado são muito importantes, pois vão influenciar a absorção de nutrientes e, consequentemente, o crescimento dos animais. Este tema é abordado no capítulo 2.5.

1.4 Flora microbiana no tracto digestivo

A microflora do tubo digestivo do coelho varia ao longo do tracto gastrointestinal e a sua composição evolui com a idade do animal (Pinheiro e Mourão, 2006).

Em 1965, Smith descobriu que os láparos em aleitamento são os únicos, de entre nove espécies animais estudadas (vitelos, láparos, ratos, pintos, porquinhos-da-índia, leitões, borregos, cachorros e gatinhos), que apresentam um conteúdo estomacal e do intestino delgado praticamente estéril e onde a implantação bacteriana, ao contrário das outras espécies, é lenta e irregular, começando na parte distal do tubo digestivo (Pinheiro e Mourão, 2006). Assim, a colonização do tracto gastrointestinal só atinge valores consideráveis (10^8 a 10^{10} (Pinheiro e Mourão, 2006)) após os 16 dias de idade, altura em que os animais iniciam a coprofagia (Smith, 1965).

Em coelhos jovens, o pH gástrico é elevado (aproximadamente 5; Aboul-Ela *et al.*, 2000), no entanto, a infecção pela *E. coli* é normalmente reduzida (Lin *et al.*, 1996). Daí, Cañas-Rodríguez e Smith (1966) e Skrivanová e Marounek, (2007) sugerirem que os láparos recebem através do leite materno compostos antimicrobianos aí existentes como lípidos antimicrobianos, imunoglobinas, oligossacáridos e lactoferrina. Os mais importantes os ácidos gordos saturados de cadeia média da gordura do leite, identificados como os ácidos caprílico e cáprico, que são ácidos gordos saturados de 8 e 10 carbonos, respectivamente.

Por volta das 4 semanas de idade, que coincide com a passagem de uma alimentação láctea para uma alimentação sólida, dá-se um desenvolvimento da flora celulolítica, mantendo-se a flora anaeróbia total a um nível elevado e estável (Pinheiro e Mourão, 2006). No animal adulto, o número de bactérias varia entre 10^9 e $3,9 \times 10^{11}$ por grama de conteúdo cecal (Gouet e Fonty, 1973; Emaldi *et al.*, 1979) e a flora bacteriana é caracterizada pela predominância de espécies anaeróbias estritas, não esporuladas (bacteróides) e pela ausência de lactobacilos e de protozoários (Gouet e Fonty, 1973).

A implantação da flora intestinal pode ser influenciada pela alimentação. Exemplo disso, é a comparação entre a alimentação exclusivamente láctea e a tradicional (leite + alimento sólido), em que a primeira provoca a ausência de flora celulolítica, mas não afecta a flora amilolítica, embora aumente o pH gástrico e cecal. Este feito vai reduzir as quantidades de ácido acético e de ácido butírico produzido e aumentar a proporção de ácido propiónico no conteúdo, o que se traduz num atraso da capacidade digestiva. Além disso, quando os animais começam a ingerir alimentos sólidos, o aumento do teor de fibra da dieta pode estimular o desenvolvimento de uma flora predominantemente celulolítica (Pinheiro e Mourão, 2006).

No tracto digestivo é normal existirem ainda as bactérias coliformes. Em coelhos saudáveis estas existem em contagem baixa (10^2 - 10^4 por g de conteúdo intestinal), mas em animais jovens, especialmente após o desmame estas provocam problemas digestivos que levam a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade e consequentemente a importantes perdas económicas por parte dos produtores (Cortez *et al.*, 1992; Licois, 2004). Um dos efeitos mais importantes dos ácidos orgânicos dá-se a nível do pH que vai afectar a flora microbiana, esse assunto será abordado no capítulo 2.3.

1.5 Actividade Enzimática Microbiana

As condições ambientais do ceco (pH, tempo de permanência do digesta, humidade e temperatura) são propícias para a sobrevivência e proliferação de microrganismos, capazes de produzirem enzimas responsáveis pela degradação de alguns constituintes da parede celular vegetal (Pinheiro e Mourão, 2006).

Ao classificarem as bactérias de acordo com a actividade fibrolítica, Boulahrouf *et al.* (1991), observaram que nos animais adultos as bactérias xilanolíticas e pectinolíticas eram as numericamente dominantes, existindo entre 10^9 e 10^{10} por grama de conteúdo cecal fresco e que as bactérias celulolíticas apenas atingiam um número da ordem das 10^7 por grama. Além disso, a presença de enzimas de origem microbiana, entre outras, ao longo do tracto digestivo é o resultado da reingestão do conteúdo cecal e explicam a digestibilidade parcial de alguns componentes da fibra antes da entrada no compartimento fermentativo (Gidenne, 1992). Na realidade, Marounek *et al.* (1995) verificaram a presença de pectinases no estômago e de celulasas, xilanasas, pectinases, inulinases e ureases no intestino delgado, este facto comprovando que a reingestão do conteúdo cecal através da cecotrofia, vai permitir uma melhor digestão dos polissacáridos não amilácios e de outros constituintes das plantas, pois vai haver uma melhor acção destas enzimas. No estômago, a actividade pectinolítica poderá ocorrer com uma intensidade semelhante à observada no cólon e cerca de metade da que é observada no ceco. Os efeitos desta actividade pectinolítica no estômago e, também no intestino delgado poderão traduzir-se por uma digestibilidade pré-cecal de 50% das pectinas da dieta. Todavia, a actividade destas enzimas poderá ser limitada pela acidez gástrica (Pinheiro e Mourão, 2006).

É importante ainda referir que a acção destas enzimas é influenciada pela idade do animal. Estudos efectuados por Pinheiro *et al.* (2001), em animais com diferentes idades (6, 10 e 24 semanas) mostraram que animais mais velhos têm uma maior produção de enzimas microbianas, nomeadamente, de pectinases e xilanasas, cerca de 80 e 50% superior. No

entanto, a celulase parece não ser afectada, uma vez que manteve a mesma produção, independentemente da idade do animal.

1.6 Fermentação Cecal

A hidrólise dos compostos orgânicos pelos microrganismos e posterior fermentação pode seguir diferentes vias metabólicas, em função da natureza do substrato, podendo também produzir diferentes produtos finais.

Da fermentação cecal surgem como produtos finais os AGV, o amoníaco (NH_3), aminoácidos e gases como o metano (CH_4), o dióxido de carbono (CO_2) e o hidrogénio (H_2) (Pinheiro e Mourão, 2006; Gidenne, 1997).

A produção dos AGV cecais dos coelhos tem uma proporção específica, podendo variar o número presente no conteúdo entre valores muito afastados (entre 30 e 110 mmol/L), considerando-se 80 mmol/L como valor médio. Esta variabilidade de valores, tanto no valor total de AGV produzidos quer na sua proporção, deve-se à quantidade e tipo de fibra que constitui a dieta. O acetato é o ácido mais produzido ($\text{C}_2 = 60$ a 80 mmol/100 mol), seguido pelo butirato ($\text{C}_4 = 8$ a 20mmol/100 mol) e depois pelo propionato ($\text{C}_3 = 3$ a 10 mmol/100mol) (Gidenne, 1997; Falcão e Cunha, 2000; Pinheiro e Mourão, 2006). As proporções molares destes AGV no conteúdo cecal variam, normalmente entre 63 e 84% para o ácido acético, entre 4 e 13% para o ácido propiónico e entre 5 e 29% para o ácido butírico (Pinheiro e Mourão, 2006).

Uma elevada parte dos AGV produzidos pelos microrganismos e absorvidos pela mucosa do ceco e do cólon, cerca de 95 a 99%, contribuem para a cobertura de 10 a 50% das necessidades energéticas das paredes do tubo digestivo, podendo também ser metabolizados no fígado e noutros tecidos. Chegam mesmo a representar no coelho adulto cerca de 30% do metabolismo basal (Parker, 1976; Marty e Vernay, 1984; Pinheiro e Mourão, 2006).

Tanto em animais em crescimento como em animais adultos, o teor dos AGV no ceco sofre variações cíclicas de acordo com o tipo de fezes em formação, atingindo os valores mais baixos durante e logo após a formação das fezes moles e os valores mais elevados imediatamente antes do início da produção de cecotrofos. De acordo com a variação da acidez volátil pode ocorrer variação do pH do conteúdo cecal, assim, os valores máximos de pH (6,0 a 6,5) são observados durante o período de cecotrofia e os mínimos (5,5 a 6,0) durante o período de excreção de fezes. (Falcão e Cunha, 2000; Pinheiro e Mourão, 2006). Esta ligeira acidificação do meio, pode ainda ter um papel importante no

crescimento da mucosa do cólon e reduzir a proliferação da *E. coli* e de outros microrganismos patogénicos (Pinheiro e Mourão, 2006).

2. Os Ácidos Orgânicos na Alimentação Animal

Os ácidos orgânicos estão largamente distribuídos na natureza, sendo constituintes naturais das plantas ou dos tecidos animais. Estes ácidos são também formados através da fermentação microbiana dos hidratos de carbono, no ceco e no intestino grosso (Partanen e Mroz, 1999).

Existe uma longa história do uso destes na alimentação e na indústria alimentar como conservantes, protegendo os alimentos da destruição microbiana e fungicida ou para aumentar a protecção de alimentos fermentados, como por exemplo, as silagens (Canibe *et al.*, 2001; Falcão-e-Cunha *et al.*, 2007). Podem ainda ser utilizados para acidificar as dietas alimentares para animais (Doyle, 2001).

Como grupo químico, considera-se como um ácido orgânico qualquer ácido carboxílico orgânico, incluindo os ácidos gordos e aminoácidos, com a estrutura geral R-COOH. De facto, os ácidos orgânicos associados à actividade antimicrobiana são ácidos de cadeia curta (C1-C7), que podem ser simples, como os ácidos monocarboxílicos (por exemplo, fórmico, acético e butírico) ou ácidos carboxílicos, tendo um grupo hidroxilo (por exemplo, láctico, málico, tartárico e cítrico). Outros ácidos ainda, tais como o ácido sórbico e fumárico, apresentam actividade antifúngica (Dibner e Buttin, 2002). Outras características também importantes residem no facto destes ácidos possuírem valor energético, por exemplo, o ácido propiónico contém 1,5 vezes mais energia que o trigo (embora como aditivos este aspecto não seja relevante) e, normalmente apresentarem odores fortes que podem reduzir a palatabilidade da dieta (Tsiloyiannis *et al.*, 2001; Diebold e Eidelsburger, 2006; Viola *et al.*, 2007).

Os ácidos orgânicos são ácidos fracos, parcialmente dissociados e na sua maioria, os que possuem actividade antimicrobiana apresentam um valor de pKa (o pH na qual o ácido se encontra 50% dissociado) entre três e cinco (Dibner e Buttin, 2002). Os ácidos orgânicos que apresentam mais de um pKa ou misturas de ácidos com diferentes pKa podem manter uma acção antimicrobiana numa maior extensão intestinal, pois têm a capacidade de se dissociarem a diferentes valores de pH (Viola *et al.*, 2007).

2.1 Utilização dos Ácidos Orgânicos

A utilização dos ácidos orgânicos e dos seus sais já vem de há várias décadas, sendo utilizados não só na alimentação animal, mas também para preservar vários alimentos consumidos pela população em geral. Podem ser utilizados individualmente ou em misturas de vários ácidos (Dibner e Buttin, 2002; Franco *et al.*, 2005) e actuam essencialmente de duas formas: através da acidificação das dietas e do seu efeito antimicrobiano.

A utilização da acidificação das dietas começou com a alimentação dos leitões como forma de compensar a baixa produção de ácido gástrico (HCl) que ocorre em animais jovens, particularmente quando sujeitos a desmame precoce. No entanto, esta redução do pH gástrico só se obtém pela adição de ácidos orgânicos e não com os seus sais. Eidelsburger *et al.* (1992) ao adicionar dosagens equivalentes de ácido fórmico e do seu sal, formato de cálcio, em dietas para leitões, verificaram que 3 horas após a ingestão, o ácido fórmico tinha reduzido o pH do conteúdo estomacal, apresentando o formato de cálcio uma tendência para aumentar o pH desse conteúdo. Verificou-se ainda que o seu uso podia também ser vantajoso nas fases mais tardias do crescimento, quando estes poderiam levar a um aumento da digestibilidade aparente da energia e da proteína e à absorção e retenção de alguns minerais (Partanen e Mroz, 1999; Diebold e Eidelsburger, 2006).

Além da função anteriormente referida, os ácidos orgânicos, principalmente os ácidos acético, butírico, cítrico, fórmico, fumárico, láctico, propiónico, sórbico e tartárico (Cherrington *et al.*, 1991; Partanen e Mroz, 1999; Dibner e Buttin, 2002), são muito utilizados como aditivos alimentares para o controlo de bactérias patogénicas, ao nível do estômago, ceco e intestino delgado, devido ao seu efeito inibidor no desenvolvimento microbiano (Gama *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2007). Assim, os ácidos de cadeia curta são os mais usados, pois as bactérias gram-negativas são capazes de apreender e metabolizar os ácidos orgânicos de cadeia média e longa (Canibe *et al.*, 2001; Cherrington *et al.*, 1991; Dibner e Buttin, 2002).

Os seus efeitos estão não só relacionados com a sua acção antimicrobiana directa, mas também com outros factores como a influência sobre a disponibilidade de nutrientes (Gama *et al.*, 2000; Skrivanová e Marounek, 2007).

Embora a maioria dos autores concorde com o efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos e que este efeito varia de ácido para ácido (Chaveerach *et al.*, 2002; Dibner e Buttin, 2002), discordam quanto à sua forma de actuação. Enquanto Chaveerach *et al.*

(2002) referem que este efeito é independente da sua concentração e pH, Cherrington *et al.* (1991) e Russel (1992) consideram que a actividade antimicrobiana está relacionada com a redução do pH, bem como com a sua capacidade de dissociação. Já Canibe *et al.* (2001) e Partanen e Mroz (1999) referem que o aumento do efeito dos ácidos orgânicos se dá com o aumento da sua concentração, assim como, com o aumento do comprimento da cadeia de carbonos e o com o grau de insaturação.

Apesar da não concordância quanto à forma de actuação, admitem que os ácidos orgânicos actuam no equilíbrio da população microbiana no intestino delgado e/ou na estimulação da actividade das enzimas digestivas (Knarreborg *et al.*, 2002).

Assim, é importante percebermos como e onde actuam estes aditivos alimentares.

2.2 Modo de acção dos Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos, na sua forma não dissociada, são solúveis em lípidos, conseguindo assim entrar passivamente na célula microbiana (Cherrington *et al.*, 1991; Russel, 1992) como se pode observar na Figura 4. Estes difundem-se através da membrana das bactérias e dissociam-se no seu interior, onde libertam os seus iões e protões, causando a acidificação do citosol o que vai comprometer a actividade celular e causar a morte dos microrganismos (Hunter e Segel, 1973; Cherrington *et al.*, 1991; Presser *et al.*, 1997; Partanen e Mroz, 1999; Roth, 2000; Canibe *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2004; Halm *et al.*, 2004). Cherrington *et al.* (1991) acreditam ainda que os ácidos podem também comprometer o transporte de substrato e a síntese de macromoléculas por parte dos microrganismos.

Os ácidos orgânicos parecem actuar, principalmente, no estômago e intestino delgado, locais em que o seu efeito é mais forte no pH do digesta e na sua acção antimicrobiana. Este efeito foi comprovado por Knarreborg *et al.* (2002), quando a adição de ácidos orgânicos, *in vitro*, levou a um decréscimo do número de bactérias coliformes no estômago e no intestino delgado.

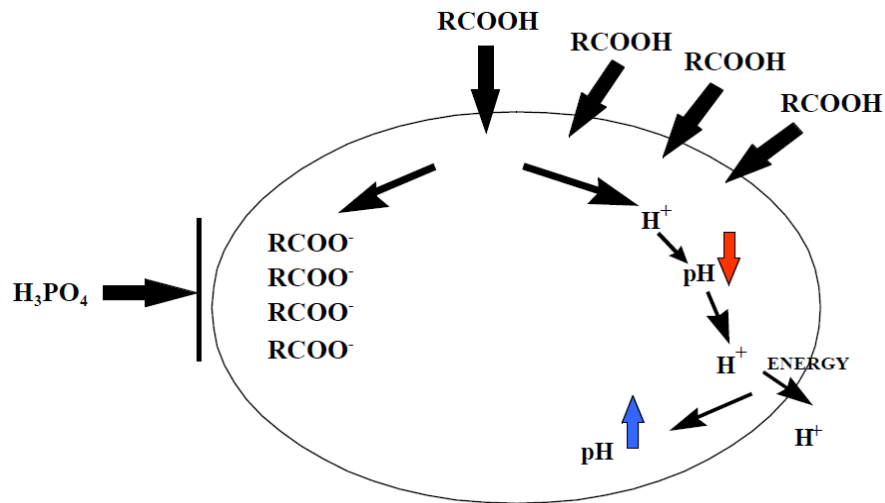


Figura 4. Modo de acção dos ácidos orgânicos em bactérias sensíveis aos gradientes de pH (Exemplo: *E.coli*, *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, entre outras) (Gauthier, 2002, adaptado de Piva A., Universidade de Bolonha, Itália).

No estômago, a presença dos ácidos orgânicos leva a uma redução do pH, o que permite que se atinja mais rapidamente o valor de 3-4. Este valor de pH é o necessário para uma óptima activação do pepsinogénio que vai permitir uma maior hidrólise das moléculas de proteína e conseqüentemente uma melhor digestão desta (Schöner, 2001). Mroz *et al.* (2000) verificaram que a adição de ácidos orgânicos, nomeadamente, os ácidos fórmico, fumárico e butírico, levava a uma melhoria de 6,1%, 4,8% e 7,5%, respectivamente, na digestibilidade ileal da proteína, que se poderá dever a uma melhor digestão no estômago. Esta adição também permite o melhoramento da actividade enzimática em geral, da actividade fítica microbiana, assim como da secreção pancreática, pois o digesta ao chegar ao intestino delgado com um valor de pH mais baixo vai levar a uma maior libertação das enzimas aí produzidas, dificultando ainda a actividade microbiana na parte proximal do intestino (Radecki *et al.*, 1988; Dibner e Buttin, 2002). Conjugando todos estes factores podemos obter uma melhoria no desempenho zootécnico do animal (Burnell *et al.*, 1988; Penz, 1991).

2.3 O que afecta a acção dos ácidos orgânicos

Foram identificados diversos factores que afectam os benefícios dos ácidos orgânicos, sendo a capacidade tampão dos componentes da dieta o mais frequentemente citado (Partanen, 2001; Dibner e Buttin, 2002).

2.3.1 A capacidade tampão

A capacidade tampão de uma dieta é um dos factores que afectam a resposta dos acidificantes, é por isso importante a escolha de ingredientes com reduzida capacidade tamponante no fabrico de rações para maximizar o aproveitamento dos nutrientes pelos animais (Büzen, 2006; Urbaityte, 2009). Os constituintes que mais contribuem para a capacidade tampão são as proteínas, os minerais e o amido. Mas enquanto os dois primeiros vão ter um efeito positivo sobre a capacidade tampão, ou seja, vão aumentá-la o último tem um efeito negativo, isto significa que vai diminuir a capacidade tampão da dieta (Dibner e Buttin, 2002; Sauvant *et al.*, 2005).

A adição dos ácidos orgânicos, tal como o amido, pode reduzir capacidade tampão da dieta, permitindo assim uma acidificação do conteúdo do sistema digestivo mais eficaz, o que vai levar a uma melhor digestão do alimento e a um maior controlo da proliferação microbiana (Dibner e Buttin, 2002).

Assim, por definição, a capacidade tampão de uma ração ou ingrediente, é uma característica inata dos alimentos, e pode ser avaliada pela capacidade ou não em neutralizar o ácido clorídrico (HCl) secretado no estômago dos animais, mantendo o pH em níveis mais elevados (Büzen, 2006; VetAgro, 2006). Esta neutralização do HCl devido ao efeito tampão diminui a habilidade dos animais em activar as suas enzimas digestivas, uma vez que no estômago, o pH ideal para a actividade enzimática se encontra por volta de 2,5. Esta característica é particularmente importante em animais jovens, que possuem o sistema digestivo imaturo, com capacidade de produção de HCl limitada (Büzen, 2006).

As dietas dadas a leitões, normalmente, têm uma elevada capacidade tampão e podem por isso impedir que ocorra uma redução satisfatória da acidez estomacal, sendo um bom exemplo em que a adição de um ácido orgânico iria beneficiar o desenvolvimento dos animais (Dibner e Buttin, 2002). A capacidade tampão de uma dieta de desmame para leitões deve encontrar-se entre os 380 e os 700 mEq/kg de alimento, não devendo nunca exceder os 700 mEq/kg de alimento (VetAgro 2006; Urbaityte, 2009).

2.3.2 Outros factores

A magnitude da resposta aos ácidos orgânicos pode ainda ser afectada pelos níveis de adição na ração, pela natureza das matérias-primas e pelo seu impacto na flora intestinal (Dibner e Buttin, 2002).

No que se refere ao impacto dos ácidos orgânicos na flora intestinal, tem sido referido que a acidificação da dieta vai impedir a competição entre as bactérias intestinais e o hospedeiro pelos nutrientes disponíveis, podendo levar a uma eventual redução da

produção de metabolitos bacterianos tóxicos, como a amónia e aminas, melhorando assim, o ganho de peso dos animais. Além disso, a inibição do crescimento de bactérias potencialmente patogénicas, nos alimentos e no tracto gastrointestinal, vai beneficiar a saúde do animal (Iba e Berchieri, 1995; Thompson e Hinton, 1997). Gálfi e Bokori (1990) verificaram que, ao adicionarem BS à ração de suínos, o número de bactérias coliformes diminuía 12,4% no íleo e 6,3% no ceco. Também Øverland *et al.* (2000) ao suplementarem o alimento composto com diformato de potássio, observaram uma diminuição significativa do conteúdo total de bactérias coliformes no duodeno, jejuno e recto. A microflora do estômago, duodeno, jejuno e íleo também sofreu uma redução com a adição de ácido benzóico, diminuindo o número de bactérias com o aumento da suplementação deste ácido (Kluge *et al.*, 2006).

Um outro factor importante na dieta e que poderá afectar a acção dos ácidos orgânicos é a presença de outros antimicrobianos. A presença de antibióticos nas dietas em que se teste a acção de ácidos orgânicos é rara, mas outros agentes antimicrobianos podem estar presentes, como valores elevados de cobre ou substâncias coccidiostáticas. Estes agentes exercem o seu próprio efeito na microflora e podem tornar o efeito do ácido orgânico redundante (Dibner e Buttin, 2002). Isto já se verificou em ensaios anteriores, quando a presença de prébioticos (Scapinello *et al.*, 2001) ou de próbioticos (Michelan *et al.*, 2002) juntamente com os ácidos orgânicos não resultou em melhorias significativas dos resultados zootécnicos dos animais.

2.4 Acção dos ácidos orgânicos

No caso dos suínos, uma análise de dados referentes aos efeitos dos ácidos orgânicos como promotores de crescimento em leitões desmamados, mostrou que os ácidos normalmente melhoram a performance, enquanto a magnitude do efeito varia com a quantidade de ácido utilizado e com os outros componentes da dieta. Exemplo disso é o ensaio realizado por Biagi *et al.* (2006) que, utilizando três valores diferentes na adição de ácido glucónico, obtiveram melhores GMD e PF. No entanto, essa melhoria foi menor para a adição de 1,2% do que para os outros dois valores (0,3 e 0,6%). Bühler *et al.* (2006) verificaram que fazendo variar o valor de proteína e a percentagem de suplementação de ácido benzóico, os animais suplementados com o ácido apresentaram uma tendência para um maior aumento de peso, o mesmo acontecendo nos animais que ingeriam um valor mais elevado de proteína.

Vários investigadores evidenciaram que os ácidos orgânicos também melhoravam a digestibilidade e a absorção de proteínas, minerais e outros nutrientes da dieta (Radcliffe *et al.*, 1998; Kemme *et al.*, 1999; Partanen e Mroz, 1999; Mroz *et al.*, 2000).

A utilização de elevados níveis de ácidos orgânicos pode levar à ocorrência de dois problemas:

- 1) A diminuição da palatabilidade, levando à ocorrência de refugo de alimento (Partanen e Mroz, 1999);
- 2) Dietas ácidas são corrosivas para o cimento e para o aço galvanizado dos alojamentos.

Para minimizar estes efeitos, a capacidade tampão natural dos alimentos, relacionada com o conteúdo mineral e vitamínico, deve ser avaliada para determinar efectivamente o valor mínimo de ácido que deve ser utilizado (Best, 2000).

Para impedir que os problemas já referidos ocorram podem utilizar-se sais de ácidos orgânicos, como os formatos e diformatos, que não são corrosivos e que podem também levar a aumentos na taxa de crescimento e conversão alimentar significativos, tal como já foi comprovado em leitões durante o desmame (Øverland *et al.*, 2000; Paulicks *et al.*, 2000). A magnitude da resposta aos agentes antimicrobianos sejam estes acidificantes ou antibióticos, é fortemente influenciada pelas condições higiénicas, por isso um menor efeito destes pode verificar-se quando a substância é testada num ambiente limpo e pouco stressante (Cromwell, 2001).

2.5 Efeitos dos Ácidos Orgânicos na Mucosa Intestinal

Alguns autores referiram que a acção dos acidificantes sobre a mucosa do intestino leva a um desenvolvimento microbiológico similar à dos antibióticos promotores de crescimento (Chaveerach *et al.*, 2004; van Immerseel *et al.*, 2004). No entanto, noutros estudos verificaram que os ácidos orgânicos alteram a população bacteriana, reduzindo o número de bactérias coliformes presentes no tracto gastrointestinal dos suínos. Esta diminuição na população microbiana vai reduzir as necessidades metabólicas e aumentar a disponibilidade de nutrientes e energia para o animal hospedeiro, resultando num aumento do crescimento do animal e da sua eficiência alimentar (Øverland *et al.*, 2000; Canibe *et al.*, 2001). Assim, é possível que esta inibição da colonização por microrganismos beneficie a mucosa intestinal e favoreça a estrutura das vilosidades, principalmente na absorção dos ácidos gordos de cadeia curta (ácidos acético, butírico e propiónico) que possuem uma acção trófica sobre a estrutura e desenvolvimento intestinais (Sakata, 1987; Dibner e Buttin,

2002; Chaveerach *et al.*, 2004; van Immerseel *et al.*, 2004; Leeson *et al.*, 2005). A adição destes ácidos pode proporcionar um aumento do tamanho das vilosidades, isto porque, estes levam ao aumento da proliferação celular, resultando numa menor descamação e são também uma fonte de energia disponível ao nível dos enterócitos. Assim, com este aumento das vilosidades vamos obter uma maior área de absorção de nutrientes (Chaveerach *et al.*, 2004; van Immerseel *et al.*, 2004). Daskiram *et al.* (2004) e Leeson *et al.* (2005) em ensaios em que adicionaram ácido fosfórico, cítrico e butírico às rações sugerem que os acidificantes auxiliam na manutenção da integridade intestinal por reduzirem os desafios microbiológicos sobre a mucosa, melhorando assim a capacidade de utilização do alimento pelos animais e reduzindo os gastos na manutenção dos tecidos intestinais. Também é importante o equilíbrio da flora microbiana no tracto gastrointestinal, uma vez que actua como barreira defensiva do animal, aderindo às paredes intestinais e impedindo a fixação dos patogénicos (Chiquieri *et al.*, 2007). Muitas vezes, o stress produtivo ou as mudanças nos padrões alimentares, causados pelo desmame dos animais, levam a um desequilíbrio microbiano que origina um ambiente favorável à fixação de microrganismos patogénicos que deste modo podem provocar modificações na estrutura da mucosa, como o encurtamento das vilosidades. Este facto leva a uma menor capacidade de absorção, resultando num menor desenvolvimento enzimático e, num menor transporte de nutrientes, predispondo os animais a uma má absorção, uma possível desidratação e a condições favoráveis a infecções entéricas (Cera *et al.*, 1988).

A profundidade das criptas é também uma medida de proliferação celular. Assim, criptas menos profundas indicam melhor estado de saúde intestinal (Viola *et al.*, 2007). As fontes e níveis de fibra dietética também influenciam a morfologia da mucosa intestinal, alterando a altura das vilosidades, a profundidade das criptas e o número de células caliciformes (Jin *et al.*, 1994; Yu e Chiou, 1997; Klasing, 1998). A relação desejável entre as vilosidades e as criptas intestinais ocorre quando as vilosidades se apresentam altas e as criptas rasas, pois quanto maior a relação entre a altura da vilosidade/profundidade da cripta, melhor será a absorção de nutrientes e menores serão as perdas energéticas com a renovação celular (Li, 1991). Alguns estudos, documentam um aumento do tamanho e largura da vilosidade com a idade (Keelan *et al.*, 1985; Yu e Chiou, 1997), assim como, alterações na sua forma, passando do formato de dedos, para o de línguas ou folhas (Van der Hage, 1988).

2.6 Efeitos dos ácidos orgânicos no tracto digestivo

Os principais efeitos dos ácidos orgânicos nas dietas de leitões desmamados têm sido extensamente examinados, consistindo principalmente na melhoria da digestibilidade da dieta e aumento das performances. Contudo, nem sempre isso se verifica, sendo que esta melhoria obtida pode ser menor do que a que se obtém com o uso de antibióticos promotores de crescimento (Ravindran e Kornegay, 1993; Partanen e Mroz, 1999; Cromwell, 2001).

Algumas equipas de investigadores testaram os ácidos cítrico, láctico e fumárico tendo-se obtido efeitos benéficos que podem ser atribuídos à acidificação do digesta, aumento da secreção pancreática e efeitos tróficos na mucosa (Dibner e Buttin, 2002), em vez de se deverem à actividade antibacteriana directa. Tonel (2009) verificou que a adição de BS reduzia ligeiramente o peso de alguns órgãos gastrointestinais dos suínos, nomeadamente, do intestino delgado, intestino grosso e fígado, não afectando, no entanto, o comprimento de nenhum dos intestinos.

3. O Ácido Butírico ou Butirato

Desde o conhecimento de que os AGP (Antibióticos Promotores de Crescimento) seriam banidos do espaço europeu a partir de 2006, que se têm efectuado diversos estudos de forma a encontrar substâncias que possam substituí-los (Guilloteau *et al.*, 2009).

Os acidificantes tornaram-se então uma das alternativas mais viáveis, sendo os ácidos cítrico, fórmico, fumárico, láctico e propiónico, ou os seus correspondentes sais, os mais utilizados em ensaios. Apesar da importância do ácido butírico ou butirato enquanto nutriente e factor trófico do epitélio intestinal, o seu estudo tem sido feito numa menor extensão, quando em comparação com os outros ácidos orgânicos (Partanen e Mroz, 1990; Knudsen *et al.*, 2003).

O ácido butírico é um ácido C4 pertencente aos SCFA (Short-Chain Fatty Acids – Ácidos Gordos de Cadeia Curta de C2 a C5), produzido por fermentação microbiana dos hidratos de carbono alimentares e dos resíduos endógenos, no rúmen das espécies ruminantes e no cólon das espécies omnívoras (Knudsen *et al.*, 2003; Kutonia *et al.*, 2004). Além de serem uma fonte de energia para o animal, os SCFA podem actuar como inibidores do crescimento de microrganismos patogénicos, facilitando assim a proliferação das células epiteliais e estimulando a capacidade imunológica (van der Klis e Jansman, 2002).

De acordo com diversos resultados é também atribuído ao ácido butírico um papel importante na manutenção da integridade da mucosa intestinal. Isto acontece pois como é o

substrato preferido pelos enterócitos e colonócitos, vai permitir um fornecimento directo de energia nestas células, aumentando, assim, o fluxo sanguíneo no ceco e no cólon e as secreções pancreáticas e de outras hormonas intestinais (Sengupta *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2008). Os SCFA, em particular o ácido butírico, tem um papel relevante na mucosa intestinal, como tal é importante que este não seja fornecido em excesso ou defeito. Quando fornecido em menor quantidade, pode provocar o aumento da apoptose associada à inflamação, diminuindo a proliferação das células nas criptas intestinais; quando administrado em excesso, pode levar a um decréscimo progressivo do pH, levando à dissociação do sal, provocando alterações na permeabilidade das células e consequentemente a lesão da mucosa (Argenzio e Meuten, 1991; Butel *et al.*, 1998; Kien *et al.*, 1999).

O facto de se ter observado que o butirato pode ser rapidamente absorvido através do estômago e assim não chegar ao intestino, levou a que se utilizasse actualmente os sais de butirato revestidos; estes são gradualmente digeridos no intestino delgado libertando assim o butirato (Bugaut, 1987; Claus *et al.*, 2007). Embora o ácido butírico seja a forma utilizada pelas células, a nível comercial é normal recorrer aos seus sais de cálcio e sódio, pois estes são sólidos e estáveis, possuem menos odor e são mais facilmente misturados na dieta (Roediger (a), 1980; Roediger (b), 1980; Cummings e Englyst, 1995; Kotunia *et al.*, 2004; Guilloteau *et al.*, 2009).

3.1 O Butirato de Sódio

A possibilidade da utilização de suplementação com butirato de sódio (BS) tem vindo a ser testada nos últimos anos provando-se que a resposta a esta adição é variável, dependendo deste modo da idade dos animais, da duração da suplementação e do tipo de dieta (Weber e Kerr, 2008). Ao contrário de outros ácidos orgânicos utilizados não diminui o pH da dieta (Gálfi e Bokori, 1990), o que indica que os seus efeitos se devem em geral a acções biológicas das moléculas em vez do seu carácter ácido (Kotunia *et al.*, 2004). Também já se verificou que esta adição de BS leva a alterações tróficas na estrutura do estômago e do intestino delgado (Kotunia *et al.*, 2004), sendo também citado que esta suplementação aumenta significativamente a proliferação de células estaminais nas criptas intestinais. Este facto vai afectar positivamente o tamanho das vilosidades intestinais, aumentando a área de absorção do intestino, principalmente no jejuno e íleo, influenciando assim favoravelmente a absorção de nutrientes (Salminen *et al.*, 1998), promovendo também a absorção de água e sódio (Bond e Levit, 1976). Outra acção importante é que o

BS modula a microflora intestinal, dependendo das adaptações das bactérias às variações químicas de acidez (Gálfi e Bokori, 1990; Castillo *et al.*, 2006; Mroz *et al.*, 2006).

Treem *et al.* (1994) e Sengupta *et al.* (2006) mostraram ainda que o BS induz a diferenciação celular e também tem importantes funções reguladoras no que diz respeito ao crescimento, à proliferação e apoptose celular da mucosa colónica normal. Mentschel e Claus (2003) verificaram que o butirato produzido no cólon pela fermentação bacteriana inibe a apoptose da mucosa, já Clausen *et al.* (1991) mostraram que embora isso aconteça o BS também inibe o crescimento das células cancerígenas.

Acresce-se ainda que estudos efectuados com butirato demonstram que este pode ter um papel muito importante na prevenção do desenvolvimento de cancro do cólon (Avivi-Green *et al.*, 2002). Embora ainda não se tenha a certeza de como este actua, Thornton (1981) propõe que a produção de SCFA pode afectar as funções das células e baixar o pH no cólon, prevenindo e reduzindo assim a formação de células cancerígenas. Também Avivi-Green *et al.* (2002) referem que já foi demonstrado que níveis elevados de butirato inibem a ocorrência de tumorigénese no cólon através do controlo da transcrição, expressão e actividade de proteínas chave envolvidas na apoptose das células.

Como se pode verificar, são muitas as vertentes em que já se estudou a adição de BS e, seguidamente podemos encontrar uma síntese dos resultados obtidos por diversos autores em ensaios relacionados com alimentação animal.

Estes resultados são muito diversificados, variando mesmo dentro da mesma espécie. A adição de butirato de sódio, embora nem sempre resulte em benefícios significativos, parece melhorar sempre o GMD dos animais (Quadro 1). No entanto, o mesmo não se verifica com a QI, que apresenta uma grande variabilidade, sendo umas vezes superior no regime BS e outras no regime de referência. Apesar disso, em geral, os investigadores registaram um melhor IC nos animais suplementados com butirato (Quadro 1).

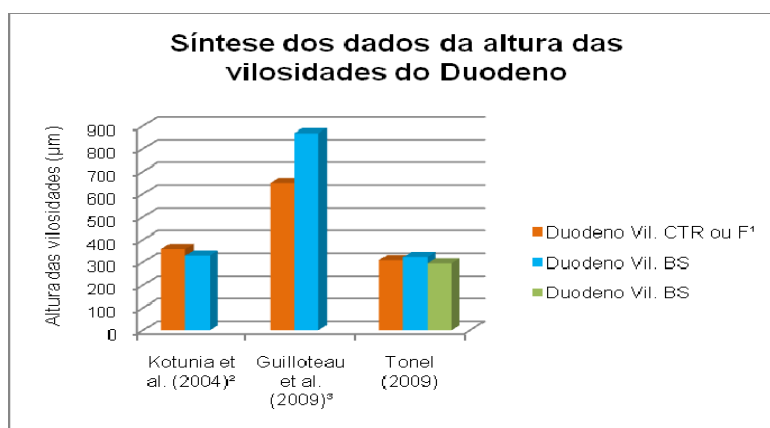
Quanto ao seu efeito na mucosa intestinal, o butirato tem diferentes efeitos. No duodeno, como se pode observar nos Gráficos 1 e 2, os resultados diferem. Enquanto num ensaio obtiveram com a suplementação vilosidades mais curtas e criptas mais profundas (Kotunia *et al.*, 2004) noutra obtive-se o oposto, com vilosidades mais compridas e criptas de igual profundidade (Guilloteau *et al.*, 2009). No jejuno (Gráficos 3 e 4), tal como nos resultados do duodeno, obtiveram-se resultados contraditórios nos diversos autores. No íleo, parte do intestino delgado onde se efectuaram mais estudos sobre a adição do BS, no geral, obtiveram-se vilosidades mais compridas nos animais em que foi adicionado o BS à

ração, no entanto, apenas metade dos investigadores observou o efeito esperado da redução da profundidade das criptas intestinais (Gráficos 5 e 6).

Quadro 1. Síntese de dados publicados dos efeitos da suplementação com Butirato de Sódio na performance de suínos, coelhos e vitelos.

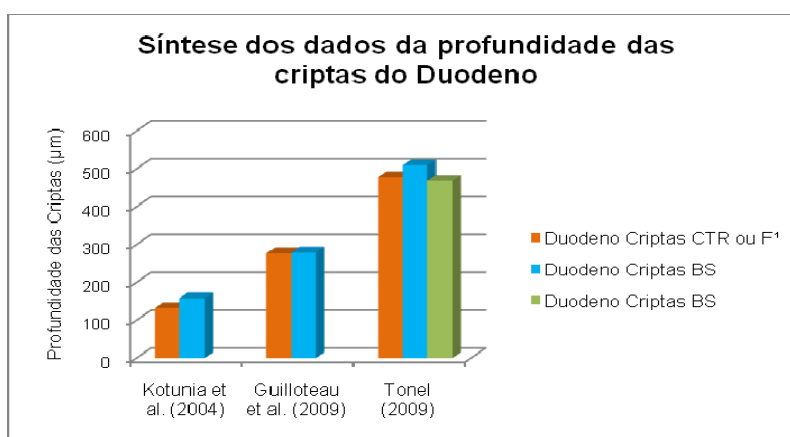
Referência	Espécie	Idade Inicial (dias)	Duração do ensaio (dias)	Nº de Animais	Nível de BS (%)	GMD (g/dia)	QI (g/dia)	IC ³ (G:F) ⁵
Gálfi e Bokori (1990)	Suínos	31	215	164	0,17	362 CTR vs 447 BS	1408 CTR vs 1533 BS	3,89 CTR vs 3,43 BS
Hullar <i>et al.</i> (1996)	Coelhos	42	28	30	0,15	—————	2670 CTR vs 2529 BS ¹ 2504 BS ²	3,29 CTR vs 2,80 BS ¹ 2,73 BS ¹
					0,30			
Piva <i>et al.</i> (2002)	Suínos	28	53	40	0,80	373±55 CTR vs 409±108 BS	645±51 CTR vs 645±36 BS	549±13 CTR vs 524±16 BS ¹
Carraro <i>et al.</i> (2005)	Coelhos	28	42	220	0,05	48,5 CTR vs 49,9 BS 50,0 BS	138 CTR vs 143 BS 143 BS	2,85 CTR vs 2,87 BS 2,85 BS
					0,10			
					0,20			
Manzanilla <i>et al.</i> (2006)	Suínos	18-22	14	32	0,30	124,7 CTR vs 177,4 BS	238,6 CTR vs 277,0 BS	1,79 CTR vs 1,56 BS
Biagi <i>et al.</i> (2007)	Suínos	28	36	48	0,10	480 CTR vs 493 BS 528 BS	773 CTR vs 777 BS 835 BS	628 BS 620 CTR vs 635 BS 634 BS
					0,20			
					0,40			
Weber e Kerr (2008)	Suínos	Desmamados	28	180	0,05	257 CTR vs 258 BS 261 BS 231 BS	350 CTR vs 357 BS 340 BS 326 BS	727 BS 732 CTR vs 724 BS 766 BS 708 BS
					0,10			
					0,20			
					0,40			
Guilloteau <i>et al.</i> (2009)	Vitelos	12	145	88	0,30	1139±14 F ⁴ vs 1177±14 BS ¹	—————	1,54±0,002 F ⁴ vs 1,48±0,001 BS ¹
Tonel (2009)	Suínos	21	35	36	0,50	593 CTR vs 610 BS 620 BS	905 CTR vs 961 BS 964 BS	1,70 CTR vs 1,62 BS 1,57 BS
					0,25			

Diferenças significativas: ¹ P<0,05; ² P<0,01; ³ IC: Índice de Conversão; ⁴ F: Flavomicina; ⁵ G:F : Gain:Feed (Ganho peso/consumo de alimento).



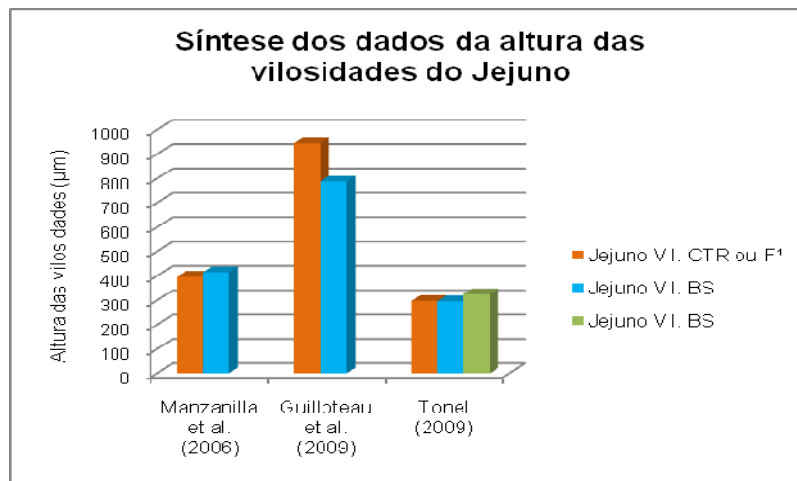
¹ F: Flavomicina; ² P<0,01; ³ P<0,05

Gráfico 1. Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na altura das vilosidades do Duodeno. Ensaios realizados em suínos (Kotunia *et al.*, 2004; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009).



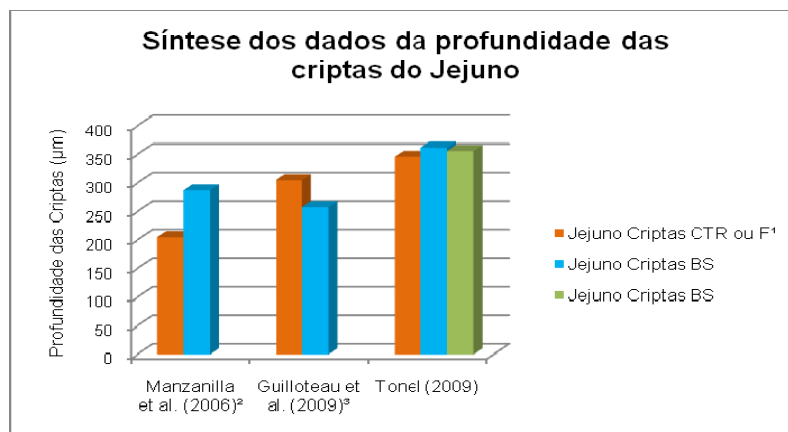
¹ F: Flavomicina

Gráfico 2. Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na profundidade das criptas do Duodeno. Ensaios realizados em suínos (Kotunia *et al.*, 2004; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009).



¹ F: Flavomicina

Gráfico 3. Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na altura das vilosidades do Jejunio. Ensaios realizados em suínos (Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009).



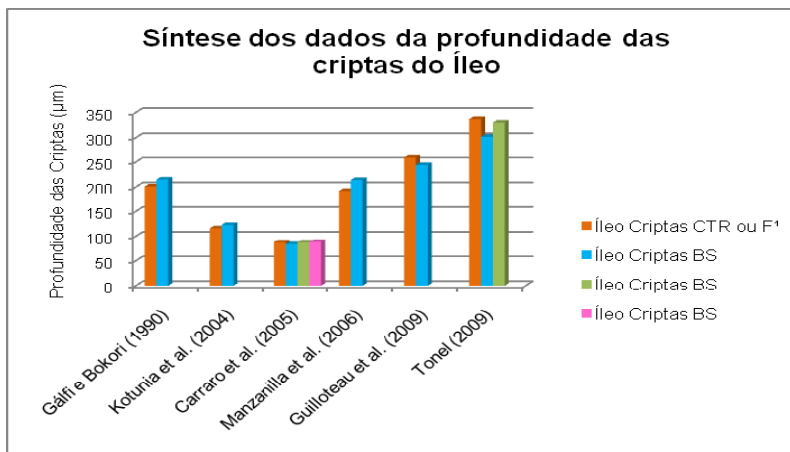
¹ F: Flavomicina; ² P<0,05; ³ P<0,01

Gráfico 4. Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na profundidade das criptas do Jejunio. Ensaios realizados em suínos (Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009).



¹ F: Flavomicina; ² P<0,001

Gráfico 5. Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na altura das vilosidades do íleo. Ensaios realizados em suínos (Gálfi e Bokori, 1990; Kotunia *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009), coelhos (Carraro *et al.*, 2005) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009).



¹ F: Flavomicina

Gráfico 6. Síntese dos dados de ensaios realizados com BS, do seu efeito na profundidade das criptas do Duodeno. Ensaios realizados em suínos (Gálfi e Bokori, 1990; Kotunia *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2006; Tonel, 2009), coelhos (Carraro *et al.*, 2005) e vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009).

Na preparação dos regimes alimentares utilizou-se um sistema de pré-moenda, assim, iniciou-se o processo com a moenda das matérias-primas, utilizando-se um moinho de martelos com um crivo de 3mm. De seguida, foram pesadas as quantidades de matérias-primas e misturadas, utilizando um misturador fixo horizontal, com fita em espiral. A mistura foi então granulada, utilizando-se uma matriz de 3mm. Após o arrefecimento da ração já granulada foram retiradas duas amostras de alimento por regime e por fabrico.

Quadro 2. Composição das dietas (% alimento) e correspondente Composição Química.

Ingredientes	Dieta Controlo	Dieta Butirato 0,5	Dieta Butirato 0,3
Trigo	25,7	25,2	25,4
Aveia	15,0	15,0	15,0
Bagaço de Soja	20,0	20,0	20,0
Luzerna	35,0	35,0	35,0
Óleo Vegetal	3,0	3,0	3,0
Complexo Mineral e Vitamínico	0,2	0,2	0,2
Carbonato de Cálcio	0,5	0,5	0,5
Fosfato Bicálcico	0,6	0,6	0,6
Butirato de Sódio	0,0	0,5	0,3
Composição Química em MS			
Matéria Seca	90,5	90,2	90,5
Cinza	6,0	6,2	6,0
Matéria Orgânica	93,3	93,1	93,4
Proteína Bruta	16,8	17,2	17,0
NDF ¹	36,5	34,4	35,5
ADF ²	20,4	18,8	19,6
ADL ³	4,1	3,1	3,2
Celulose	16,1	15,6	15,9
Hemicelulose	16,3	15,7	16,4
Energia Bruta (Kcal)	4156	4172	4174

¹ NDF = Fibra Neutro-Detergente; ²ADF = Fibra Ácido-Detergente; ³ ADL = Lenhina Ácido-Detergente

Quadro 2.1. Composição do Complexo Mineral e Vitamínico por kg de alimento.

Vitaminas		Minerais	
A (Retinol) ¹	4800	Ferro (Carbonato Ferroso) ²	28
D3 (Colecalciferol) ¹	480	Cobre (Sulfato Cúprico Penta-Hidratado) ²	2,4
E (Alfatocoferol) ¹	10	Manganês (Óxido de Manganês) ²	7,2
B1 (Tiamina) ²	0,8	Zinco (Óxido de Zinco) ²	24
B2 (Riboflavina) ²	2	Iodo (Iodeto de Potássio) ²	0,2
B3 (PP ou Niacina) ²	12	Cobalto (Carb. Básico de Cobalto Mono-Hidratado) ²	0,04
B5 (Ácido Pantoténico) ²	6	Selénio (Selenito de Sódio) ²	0,04
B6 (Piridoxina) ²	0,8		
B12 (Cianocobalamina) ²	0,006		
H (Biotina) ²	0,016		
Colina (Cloreto de Colina) ³	0,3		

¹ U.I.: Unidades Internacionais; ² Miligramas; ³ Gramas

3. Ensaio Pós-Desmame

Foi utilizado um segundo grupo de animais, com 30 coelhos, divididos em dois grupos de peso homogêneo. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de digestibilidade e foram tratados de modo similar aos do Ensaio Zootécnico, ou seja, a um grupo foi distribuída ração CTR e ao outro ração BS, tendo sido abatidos após duas semanas de ensaio. Durante a segunda semana de ensaio foram feitas recolhidas de fezes para a realização das análises de digestibilidade.

Após o abate dos animais foi recolhido o conteúdo estomacal e cecal para medição do pH, utilizando-se ainda o conteúdo cecal para a determinação da matéria seca, actividade enzimática e ácidos gordos voláteis. Registou-se também o peso do aparelho digestivo cheio com o fígado, assim como o peso individual dos órgãos, nomeadamente, fígado, estômago (cheio e vazio) e ceco (cheio e vazio). Foi ainda medido o comprimento do intestino delgado e recolheram-se amostras deste para posterior observação e medição microscópica das vilosidades e criptas intestinais. Todos estes parâmetros foram utilizados de forma a controlar o desenvolvimento do aparelho digestivo.

A Matéria Orgânica (MO) é calculada através da diferença:

$$MO = MS - \text{Cinza.}$$

4.3 Determinação da Fibra

A Fibra Neutro-Detergente (NDF), a Fibra Ácido-Detergente (ADF) e a Lenhina Ácido-Detergente (ADL) foram determinadas utilizando o método de Van Soest *et al.* (1991), para os regimes alimentares e fezes, usando o sistema Fibertec 1021 (Tecator).

Calculou-se ainda os valores de Hemicelulose e Celulose, através das seguintes fórmulas:

$$NDF - ADF = \text{Hemicelulose;}$$

$$ADF - ADL = \text{Celulose.}$$

4.4 Determinação da Proteína Bruta

A Proteína Bruta (PB) foi obtida empregando o método de Kjeldahl nas amostras de alimentos e fezes. Para tal foi utilizado um Mineralizador 2020 Digestor (Tecador) e um Destilador Kjelttec System 1026 (Tecador).

4.5 Determinação da Energia

Avaliou-se ainda a energia presente nos alimentos e fezes, para isso foi utilizado um Calorímetro Parr 1261.

4.6 Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis

Esta determinação implicou uma preparação prévia das amostras de conteúdo cecal. Primeiro foi necessário descongelar as amostras que se encontravam congeladas a -20°C e centrifugar (Beckmann J2-HS) a 5000 rpm durante 15 minutos. Após centrifugação foi retirado 1 ml do sobrenadante, em duplicado, para eppendorfs.

Utilizando o Cromatógrafo 8410 (Perkin-Elmer) e seguindo o método de cromatografia gasosa de Jouany (1982), obtivemos os valores de ácidos gordos voláteis presentes nas amostras.

4.7 Determinação da Actividade Enzimática

Tal como na determinação dos ácidos gordos voláteis esta análise necessita de uma preparação prévia das amostras de conteúdo cecal.

Primeiramente é necessário fazer dois ciclos de congelar e descongelar, mantendo sempre as amostras a 4°C ou a uma temperatura inferior a essa. Depois disso, seguem-se quatro períodos de sonicação de 30 segundos intervalados com períodos iguais de repouso, utilizando um Sonicador HD 2070 (Bandelin). Centrifugou-se então as amostras, recorrendo a uma Centrifuga Beckmann J2-HS a 15 000 rpm durante 15 minutos, permitindo assim a separação das fases sólidas e líquidas destas, que permitiram recolher em triplicado 1,5 ml de sobrenadante para eppendorfs, que foram de imediato congelados a -20°C.

De acordo com o método de Jehl *et al.* (1996), determinou-se a actividade de três enzimas, a xilanase, a pectinase e a celulase. Esta actividade foi contabilizada fazendo reagir 50 µl de extracto enzimático com 500 µl de xilana (Sigma X-0502), de pectina de maçã (Sigma P-8471) ou de carboximetilcelulose (CMC, Sigma C-5678) e 150 µl de solução tampão fosfato de pH 6, mantida em banho-maria a 39 °C. As reacções enzimáticas foram medidas aos 0 e aos 30 minutos, adicionando-se ácido dinitrosalicílico que interrompeu a reacção. Os açúcares libertados, glucose, xilanose e ácido galactorónico foram doseados de acordo com o método de Miller (1959), utilizando um Espectrofotometro calorimétrico, Hitachi U-2001. As leituras foram efectuadas a um valor de 575 nm de absorvância, comparando-se o conteúdo dos eppendorfs com a curva padrão e a actividade enzimática foi expressa em mg de açúcar libertado por hora e por g de conteúdo cecal na MS.

4.8 Determinação do pH

Após o abate dos animais procedeu-se à medição do pH dos conteúdos, nomeadamente do conteúdo estomacal e cecal, após a sua homogeneização. Para tal foi utilizado um potenciómetro Meter 744 (Metrohm).

4.9 Determinação da Capacidade Tampão dos regimes

A determinação do Poder Tampão foi efectuada de acordo com dois métodos. Primeiro seguindo o método descrito por Bünzen (2006), em que dissolvemos 10g de alimento em 90g de água destilada. Após homogeneização da mistura mediu-se o pH endógeno da ração utilizando um potenciómetro Meter 744 (Metrohm), ao qual se adicionou depois HCl 0,1N até atingir pH 4 e depois até pH 3.

O segundo método utilizado foi desenvolvido por Playne e McDonald (1966) e é em tudo semelhante ao que efectuamos anteriormente, mas primeiro descemos o pH a 2,2 (pois trata-se do valor médio do pH no estômago dos animais abatidos), subindo-o de seguida até pH 6 com a adição de NaOH 0,1N.

O poder tampão mede-se no primeiro caso pela utilização de HCl, ou seja, o volume gasto deste ácido corresponde ao poder tampão. No segundo caso, o poder tampão corresponde ao volume gasto de hidróxido de sódio para elevar o pH de 2,2 até 6.

4.10 Análise das Mucosas Intestinais

A análise das mucosas intestinais foi efectuada na Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, nomeadamente no Departamento de Morfologia e Função.

Após o abate foram recolhidas amostras do intestino delgado de 20 animais, para posterior observação microscópica e medição das vilosidades e criptas intestinais. Estas amostras foram recolhidas do duodeno, jejuno e íleo, cortadas a 40 cm do piloro para o duodeno, a 40 cm da válvula íleo-cecal para o íleo e cortando no meio do segmento total considerando aí o jejuno, fixadas em formol tamponado e processadas para inclusão em parafina.

Os cortes histológicos com 7 µm de espessura, foram corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram observadas ao microscópio Olympus BX 511, utilizando as objectivas de 4x e 10x, as imagens captadas por uma câmara digital (Olympus DP 11) e posteriormente colocadas num computador, foi utilizando o programa Olympus DP Soft, mediu-se a altura e a largura de 10 vilosidades e a profundidade de 10 criptas, íntegras e bem orientadas, por segmento intestinal e por animal.

4.10.1 Contagem de Coccídias

Para proceder à contagem de coccídias nos cortes histológicos do intestino dos animais utilizou-se o seguinte método: para que a contagem fosse completamente aleatória, escolhemos começar pelo lado superior esquerdo do corte e utilizando a objectiva de 100x do microscópio Olympus BX 511, contou-se o número de coccídias presentes em 5 campos microscópicos consecutivos. Esta contabilização foi feita nos cortes das três zonas do intestino (duodeno, jejuno e íleo).

5. Parâmetros Estudados

Durante o período de ensaio foram recolhidos dados que permitiram avaliar os seguintes parâmetros:

- **Quantidade Ingerida (QI)** de alimento, que representa a quantidade de alimento que os animais ingeriram diariamente calculando-se da seguinte forma:

$$QI = (AD-R) / n^{\circ} \text{ dias,}$$

sendo AD o alimento distribuído e o R o refugo. O resultado foi apresentado em gramas por dia (g/dia).

- **Ganho Médio Diário (GMD)**, representa o quociente entre o ganho de peso e o número de dias que há entre cada pesagem:

$$GMD = (P2-P1) / n^{\circ} \text{ dias,}$$

sendo P2 o peso actual do animal e P1 o peso anteriormente registado. O resultado foi apresentado em gramas por dia (g/dia).

- **Índice de Conversão (IC)**, que representa a quantidade de alimento necessária para que o animal aumente um quilograma de peso. Este parâmetro calcula-se pelo quociente entre a QI e o ganho de peso do animal no mesmo intervalo de tempo:

$$IC = QI / \Delta p,$$

sendo o Δp o aumento de peso do animal num determinado período de tempo.

- **Coefficiente de Utilização Digestiva (CUD)** que quantifica a digestibilidade e representa a percentagem do elemento ingerido que é absorvido. Foi calculado o CUD da Matéria Seca (MS), Matéria Orgânica (MO), Proteína Bruta (PB), fibras (NDF, ADF, ADL), Hemicelulose (HEM), Celulose (CEL) e da Energia.

$$CUDap = \left[\frac{\text{Elemento Ingerido} - \text{Elemento Excretado}}{\text{Elemento Ingerido}} \right] \times 100$$

6. *Análise Estatística*

As análises estatísticas dos resultados foram sujeitas a uma análise de variância de 1 factor, pela aplicação do software SAS System for Linear Models (2002-2003). Para todos os testes foi usado um intervalo de confiança de 5%.

IV. Resultados e Discussão

O Butirato de sódio utilizado neste trabalho é uma marca comercial registada e é um sal sódico de ácido butírico protegido por gordura. A sua finalidade é actuar como antimicrobiano selectivo na parte final do tubo digestivo, controlando o desenvolvimento da *Salmonella* e de outros microrganismos patogénicos e também, estimular o desenvolvimento das vilosidades intestinais, melhorando assim os resultados de crescimento.

1. Ensaio de Crescimento

Os resultados referentes ao **Ensaio Zootécnico** encontram-se no Quadro 3. Neste podemos observar que os coelhos do regime CTR apresentaram melhores resultados zootécnicos durante as duas primeiras semanas, apresentando diferenças significativas ($P < 0,005$) no ganho médio diário (GMD) e na quantidade média ingerida (QI) por coelho, dos animais do regime BS embora o índice de conversão (IC) tenha sido menor no regime BS (1,61 com CTR vs 1,58 com BS), ou seja, embora o aumento de peso e a ingestão de alimento tenha sido menor nos animais do regime BS estes foram mais eficientes na utilização deste.

No início do segundo período de ensaio, correspondente às 4 últimas semanas, os animais do regime BS apresentam um peso significativamente menor que os animais do regime CTR (859,8g BS vs 930,5g CTR), embora, no final deste período os pesos já não apresentaram diferenças significativas. Este facto deve-se a um maior GMD e um melhor IC por parte dos animais do regime BS ($P = 0,05$ e $P < 0,016$, respectivamente).

No entanto, e considerando o período total, o GMD dos coelhos de ambos os regimes foi idêntico (44,0 vs 44,8g/d), embora a QI de alimento com o regime BS ter sido inferior ($P < 0,015$) à do regime CTR. Este facto reflectiu-se num IC significativamente melhor ($P < 0,016$) para os animais que ingeriram BS. Esta melhoria deveu-se ao maior aumento de peso verificado dos animais com regime BS nas últimas 4 semanas.

É ainda de mencionar que no 1º período de ensaio ocorreram 1 morte no regime CTR vs 2 no regime BS, e no período total estes valores foram de 7 mortes vs 10.

Numa menor escala, no **Ensaio de Crescimento Pós-Desmame**, também foi contabilizado o crescimento dos animais. É de referir que estes animais sendo abatidos 15 dias após o início do ensaio, foram apenas alimentados com a ração com 0,5% de inclusão de BS, um valor um pouco superior ao valor que é sugerido comercialmente (0,3%), com o

objectivo de verificar se este afectava positivamente os animais, uma vez que estes sofreram um desmame precoce. No entanto, ao contrário do que se constatou no Ensaio Zootécnico, neste grupo de 30 animais, não se verificaram diferenças significativas entre os dois regimes alimentares (Quadro 4). Embora os resultados registados com os animais do regime CTR tenham sido superiores aos do regime BS verificou-se um melhor IC, tal como no Ensaio Zootécnico (1,53 CTR vs 1,51 BS). A menor ingestão de alimento conduziu assim a um melhor IC. Podemos por isso dizer que devido ao reduzido número de animais presentes neste ensaio (30 animais) e a uma variabilidade elevada nos valores registados, não se obteve diferenças estatisticamente significativas, mas se observarmos os valores do Ensaio Zootécnico (180 animais) verificamos que a tendência que aqui se verifica se torna real, diferindo os valores significativamente nos parâmetros anteriormente referidos.

A resposta positiva, mas tardia (no 2º Período do Ensaio Zootécnico), da adição de butirato foi oposta à verificada por Piva *et al.* (2002) num ensaio em leitões em que inicialmente ocorreu uma resposta positiva ao BS anulando-se posteriormente. Já Biagi *et al.* (2007) e Tonel (2009), também em leitões, não apuraram efeitos positivos nos resultados zootécnicos dos animais durante o período de suplementação com BS. No entanto, tanto Manzanilla *et al.* (2006) como Gálfi e Bokori (1990) verificaram que a suplementação com BS tinha efeitos positivos, melhorando o IC nas primeiras 2 semanas após o desmame dos leitões no primeiro estudo e uma melhoria significativa de todos os parâmetros estudados no caso do segundo. O mesmo foi observado por Kotunia *et al.* (2004) em leitões recém-nascidos, que obtiveram uma melhoria de resultados, nomeadamente no GMD e no PF dos animais.

O BS foi também estudado noutras espécies além dos suínos. Em coelhos, os resultados variaram, enquanto Carraro *et al.* (2005) apenas registaram uma tendência positiva com a adição de BS, Hullar *et al.* (1996) obtiveram melhorias significativas no desempenho zootécnico dos animais, no entanto, esta melhoria deu-se com a inclusão de BS mas não com a concentração, pois não se observaram diferenças entre os dois níveis de suplementação (0,15 e 0,3%).

Estudos foram também efectuados em frangos (Leeson *et al.*, 2005) e galinhas poedeiras (Sánchez *et al.*, 2008), mas enquanto no primeiro caso não se obtiveram melhorias, no segundo estudo deu-se uma melhoria, não só do IC mas também de algumas propriedades do ovo.

Quadro 3. Efeito do Butirato de Sódio no crescimento e performance de coelhos.

Índices	1º Período Ensaio (2 primeiras semanas)			2º Período Ensaio (4 últimas semanas)			Período Total Ensaio		
	Controlo	Butirato	P	Controlo	Butirato	P	Controlo	Butirato	P
PI (g) ¹	371,0	370,9	NS	930,5	895,8	0,017	370,9	370,9	NS
PF (g) ²	933,2	888,5	0,002	2077,9	2110,7	NS	2086,8	2110,7	NS
GMD (g/dia)	40,1	37,0	0,002	46,1	48,1	0,054	44,0	44,8	NS
QI (g/dia) ³	63,9	57,2	<0,001	121,4	118,2	NS	101,6	96,4	0,015
IC	1,61	1,58	0,026	2,65	2,57	0,016	2,30	2,23	0,016

¹ PI: Peso Inicial; ² PF: Peso Final; ³ QI: Quantidade Ingerida

Quadro 4. Efeito da adição do Butirato de Sódio no crescimento e performance de coelhos no Ensaio de Pós-desmame.

	PI (g) ¹	PF (g) ²	QI Total (g) ³	QI/d (g/d)	AP ⁴ 1ª Sem. (g)	AP 2ª Sem. (g)	AP Total (g)	IC ⁵
Controlo	451,3	1070,0	945,5	67,5	251,4	367,2	618,7	1,53
Butirato	450,5	1021,0	854,7	61,0	243,7	326,8	570,5	1,51
P	NS	NS	0,114	0,114	NS	0,112	NS	NS

¹ PI: Peso Inicial; ² PF: Peso Final; ³ QI: Quantidade Ingerida; ⁴ AP: Aumento de Peso; ⁵ IC: Índice de Conversão

Recentemente foi estudada a adição de BS em vitelos (Guilloteau *et al.*, 2009), obtendo-se uma melhoria significativa no GMD e do IC, resultados semelhantes aos obtidos no 2º Período do Ensaio aqui apresentado.

No presente ensaio, os animais foram inicialmente alimentados com uma ração com 0,5% de suplementação de BS, tendo sido alterada ao fim de 2 semanas para uma com 0,3% de BS. Esta alteração foi efectuada com o objectivo de ver se uma suplementação mais elevada do que a sugerida comercialmente, 0,3%, afectava positivamente os animais na totalidade do período de crescimento e acabamento. Isto não se verificou uma vez que no 1º Período de ensaio os animais do regime CTR tiveram uma melhor performance, invertendo-se a situação no 2º Período de ensaio, o que leva a sugerir que, nas nossas condições experimentais, o BS provavelmente actuou a longo e não a curto prazo, é também possível que não sejam necessárias doses muito elevadas de suplementação (>0,5%). De acordo com Hullar *et al.* (1996), que tal como referido anteriormente testaram dois valores de suplementação, sugerem mesmo que uma vez que não se verificaram diferenças significativas entre 0,15% e 0,3%, utilizar mais de 0,15% de BS não será vantajoso. No entanto, para que tal seja comprovado serão necessários mais estudos com este aditivo alimentar. É relevante referir ainda, que os bons resultados obtidos em ensaios que decorreram há 10, 20 anos atrás podem não estar a verificar-se actualmente, pois a acção do ácido orgânico é menor em ambientes com baixo stress e contaminação, factores que foram alterados neste período de tempo, de forma a melhorar o bem-estar animal (Cromwell, 2001).

Considerando toda a bibliografia referida anteriormente podemos aferir que a utilização de BS leva a resultados muito contraditórios, variando com a espécie animal, a idade inicial dos animais, a duração do ensaio e também de acordo com a constituição da dieta (Urbaityte, 2009).

2. Digestibilidade Fecal Aparente

A adição de BS na alimentação dos coelhos parece não afectar a digestibilidade aparente da quase totalidade dos compostos estudados, uma vez que apenas se verificaram diferenças significativas a nível do ADL ($P=0,012$), como se pode observar pelos resultados no Quadro 5. Estes resultados contrariam os obtidos por Hullar *et al.* (1996) que registaram uma melhor digestibilidade de todos os parâmetros estudados. Tonel (2009) com a adição de BS apenas obteve melhores digestibilidades da PB e do ADF, mostrando assim a variabilidade de resultados que envolve esta suplementação.

Quadro 5. Efeito da adição do Butirato de Sódio na digestibilidade fecal aparente (%).

	CUD ¹ MS	CUD MO	CUD PB	CUD NDF	CUD ADF	CUD ADL	CUD EN	CUD HEM	CUD CEL
Controlo	66,3	66,2	85,3	24,7	13,3	11,5	67,0	38,8	13,6
Butirato	66,7	66,6	85,0	25,3	14,2	6,4	67,1	38,9	15,7
P	NS	NS	NS	NS	NS	0,012	NS	NS	NS

¹ CUD: Coeficiente de Utilização Digestiva

Embora nos coelhos suplementados com BS se tenha verificado um melhor IC e uma ligeira melhoria no rendimento de carcaça este parece não se dever a uma melhor digestibilidade dos nutrientes, pois embora se verifiquem resultados ligeiramente melhores para os animais com suplementação, não se obtiveram diferenças significativas. Este facto pode dever-se, a termos fornecido o ácido orgânico revestido, o que impossibilitou a descida do pH no estômago. Este facto já havia sido referido por Diebold e Eidelsburger (2006), que afirmaram que a adição de ácidos orgânicos levava a um decréscimo do pH do estômago, mas isso não verificava quando a suplementação era efectuada com sais destes ácidos. No entanto, Mosenthin *et al.* (1992), Kluge *et al.* (2005), e Michelan *et al.* (2002) que adicionaram, respectivamente, ácido propiónico, benzóico e fórmico, também não obtiveram melhores digestibilidades, contrariando o que foi anteriormente referido.

Podemos assim verificar que a melhoria da digestibilidade dos nutrientes, que acontece em alguns estudos, com a adição dos ácidos orgânicos, não dependerá somente da forma em que estes são fornecidos mas também das condições endógenas do animal, como o pH do estômago e a secreção de enzimas digestivas.

3. Actividade Microbiana Cecal

3.1 pH dos Conteúdos e Capacidade Tampão

O pH dos conteúdos estomacal e cecal não apresentou diferenças significativas (Quadro 6). Os valores de pH registados estão dentro do intervalo considerado normal (1,0-5,0 no estômago, predominando entre 1,0 - 2,0 e, 5,5 - 6,0 no ceco (Pinheiro e Mourão, 2006)), embora se verifique um ligeiro decréscimo do pH nos dois órgãos dos animais aos quais foi fornecida a suplementação de BS. Tonel (2009) verificou um decréscimo no pH do estômago dos leitões, sem o verificar no caso do pH do ceco, íleo e cólon. Pelo contrário, Manzanilla *et al.* (2006), não encontraram melhorias nem no pH do estômago nem no do ceco, apresentando mesmo os leitões do regime BS um pH superior ao dos animais do regime controlo. Carraro *et al.* (2005), num ensaio semelhante ao ensaio em estudo, também não obtiveram diferenças significativas, observando-se apenas um decréscimo do pH do ceco com o aumento da percentagem de adição de BS.

O facto de não se apurarem, no presente estudo, diferenças significativas no pH do estômago e do ceco, pode ser tomado como um bom resultado. Pois uma vez que no nosso BS era revestido, o decréscimo de pH só deverá ocorrer no intestino delgado, local onde se pretende que ocorra a libertação do BS, para que só aí seja utilizado como fonte de energia dos enterócitos e não em qualquer outro local do tracto digestivo.

Um dos efeitos mais importantes da adição de ácidos orgânicos é a acidificação da dieta e, embora esta não se tenha verificado neste ensaio, possivelmente devido ao facto do BS ser revestido, o decréscimo do pH permitiria uma maior activação das enzimas digestivas, levando a uma maior digestibilidade e absorção dos nutrientes e conseqüentemente, a um maior aumento de peso. No entanto, o facto de não se verificar esta acidificação do conteúdo estomacal está de acordo com o que foi referido por Gálfi e Bokori (1990), que o BS ao contrário de outros ácidos orgânicos não actua baixando o pH mas sim através de acções biológicas das moléculas (Kotunia *et al.*, 2004).

O facto de não haver alterações no pH dos conteúdos também se pode dever à capacidade tampão associada aos componentes da dieta. Ao observar o Quadro 7 verificamos que a capacidade tampão das dietas não apresenta grandes variações, chegando mesmo a ser mais elevada nas dietas em que ocorreu a adição do BS.

Este facto contraria o que era esperado, pois em geral os ácidos orgânicos são adicionados para reduzir a capacidade tampão das dietas após a sua ingestão, permitindo uma acidificação mais eficaz do conteúdo do sistema digestivo (Dibner e Buttin, 2002). Este efeito já foi comprovado por Blank *et al.* (1999), quando a adição de ácido fumárico baixou a capacidade tampão da ração, independentemente do poder tampão endógeno do alimento composto ser elevado ou não. A capacidade tampão das dietas não é um assunto muito desenvolvido em coelhos, como tal, não existem valores base que uma ração deva apresentar, como acontece para suínos. O primeiro método foi utilizado para se verificar se a diminuição do pH afectaria o poder tampão da ração. Como isso não ocorreu utilizamos um segundo método que nos permitiu simular o decréscimo do pH que ocorre no estômago dos animais, subindo-o seguidamente tal como acontece na passagem para o intestino delgado. No entanto, não se verificaram alterações com este método.

Quadro 6. Efeito da adição de Butirato de Sódio no pH do estômago e ceco.		
Regimes	pH Estômago	pH Ceco
Controlo	2,28	5,76
Butirato	2,04	5,72
P	NS	NS

Quadro 7. Efeito da adição de Butirato de Sódio na Capacidade Tampão da dieta (mEq/kg de alimento).

1º Método			
Regime	pH Inicial	CT ¹ a pH4	CT ¹ a pH3
Controlo	5,65	79,0	254,0
Butirato 0,5	5,58	72,5	256,5
Butirato 0,3	5,58	69,5	241,0

2º Método		
Regime	pH Inicial	CT ¹ a pH 6
Controlo	5,67	758,0
Butirato 0,5	5,60	760,0
Butirato 0,3	5,61	795,0

¹ CT: Capacidade Tampão

3.2 Concentração dos Ácidos Gordos Voláteis

Como se pode comprovar pelos resultados do Quadro 8, a adição de BS não levou a diferenças significativas na produção de AGV, encontrando-se todos os resultados dentro dos valores considerados normais na produção de AGV (produção total entre 30 e 110 mmol/L, C2 entre 63 e 84%, C3 entre 4 e 13% e C4 entre 5 e 29% (Pinheiro e Mourão, 2006)) No entanto, considerando o valor total destes, observa-se uma maior produção por parte dos animais do regime BS (83,8 mmol/L CTR vs 96,9mmol/L BS), acontecendo o mesmo nos valores individuais de cada ácido (64,4, 6,9, 12,7 CTR vs 75,2, 7,1, 13,5 BS, para C2, C3 e C4 respectivamente). Já em relação às proporções molares, o ácido acético e propiónico apresentam valores ligeiramente superiores nos animais do regime BS, não acontecendo o mesmo no ácido butírico que é ligeiramente superior mas nos animais do regime CTR (15,1 CRT vs 13,7 BS).

Tal como os resultados obtidos neste estudo, nem Hullar *et al.* (1996) nem Carraro *et al.* (2005), em ensaios também efectuados em coelhos, registaram diferenças significativas na produção de AGV. Gálfi e Bokori (1990), Manzanilla *et al.* (2006) e Biagi *et al.* (2007) em ensaios com leitões também não observaram diferenças significativas na produção de AGV provocadas pela adição de BS. Pelo contrário, Tonel (2009) reportou diferenças significativas na produção total de AGV, de acetato, propionato e também na proporção

molar C3:C4, apresentando os animais do regime BS valores menores que os animais do regime CTR.

A obtenção destes resultados pode dever-se à adição do ácido orgânico, ou seja, ao adicionarmos um ácido, o meio pode ficar ligeiramente mais ácido o que reduz a prolificidade da *E.coli*, assim como de outros microrganismos patogénicos, conseguindo-se assim uma maior área livre para a proliferação de microrganismos favoráveis à fermentação cecal e a um ecossistema mais estável (Pinheiro e Mourão, 2006; Manzanilla *et al.*, 2006). A referida alteração na população bacteriana já foi verificada no tracto gastrointestinal de suínos (Øverland *et al.*, 2000; Canibe *et al.*, 2001).

Esta normalidade de valores também é importante, pois quando os SCFA se encontram em excesso ou em defeito no tracto intestinal, levam a consequências prejudiciais para a mucosa (inflamação e lesões da mucosa) e para o animal, pois vão afectar a sua capacidade de absorção dos nutrientes (Argenzio e Meuten, 1991; Butel *et al.*, 1998; Kien *et al.*, 1999).

Quadro 8. Efeito da adição de Butirato de Sódio na concentração dos Ácidos Gordos Voláteis (AGV) no ceco.

	Controlo	Butirato	P
AGV Totais (mmol/L)	83,9	96,9	NS
C2 ¹ Total (mmol/L)	64,4	75,2	NS
C3 ² Total (mmol/L)	6,9	8,1	0,154
C4 ³ Total (mmol/L)	12,7	13,5	NS
Proporções molares dos AGV			
C2 (mol/ 100 mol)	76,3	77,5	NS
C3 (mol/ 100 mol)	8,6	8,8	NS
C4 (mol/ 100 mol)	15,1	13,7	NS

¹ C2: Acetato; ² C3: Propionato; ³ C4: Butirato.

3.3 Actividade Fermentativa

Na actividade total das enzimas digestivas microbianas a adição de BS apenas afectou significativamente a Pectinase, apresentando os animais do regime BS um valor mais elevado que os de CTR (75,9 BS vs 64,4 CTR). Os resultados destas análises apresentam-se no Quadro 9 e estão de acordo com o que foi referido por Boulahrouf *et al.* (1991), que as bactérias em maior número no ceco seriam as pectinolíticas, seguindo-se as xilanolíticas e por fim as celulolíticas. Assim, podemos sugerir que o coelho apresenta uma maior capacidade para digerir as hemiceluloses e as pectinas do que as celuloses.

Ao contrário do observado neste ensaio, Tonel (2009) verificou um decréscimo dos valores na actividade das enzimas microbianas, sendo estes estatisticamente significativos para a Pectinase e a Xilanase.

É possível que o BS facilite a actividade da Pectinase, o que pode justificar o aumento dos AGV nos animais do regime BS, pois uma vez que há uma maior degradação dos nutrientes vai haver uma maior produção de AGV. Este aumento leva também a supor que o ligeiro abaixamento do pH estomacal que ocorreu nos animais suplementados com BS permitiu uma menor actividade pectinolítica no estômago, aumentando esta actividade no ceco.

Quadro 9. Efeito da adição de Butirato de Sódio na actividade total das enzimas digestivas microbianas (mg/h/g conteúdo cecal na MS).

	Controlo	Butirato	P
Celulase	35,8	28,6	0,1090
Pectinase	64,4	75,9	0,057
Xilanase	47,6	44,5	NS
MS no conteúdo cecal	24,2	23,8	NS

4. Resultados do Abate

Após o abate dos animais foram registados os pesos de vários órgãos, tanto em valor absoluto como relativamente ao peso vivo, assim como da carcaça, resultados que estão registados no Quadro 10.

Nestes podemos notar que com excepção do peso do fígado, que apresenta valores significativamente menores nos animais do regime BS em comparação com os do regime CTR, (65,7g nos animais CTR vs 53,5g nos animais BS ($P=0,005$)), não se verificam diferenças significativas nos vários parâmetros estudados. O efeito da adição do butirato de sódio a regimes alimentares de láparos desmamados precocemente, não teve efeito no desenvolvimento dos órgãos nas duas semanas seguintes. Mesmo assim, podemos comprovar que embora não seja significativo, os animais do regime BS têm pesos mais baixos nos órgãos estudados, estômago, fígado, ceco e intestino delgado (15,8g, 16,1g e 72,1g no regime CTR vs 14,5g, 15,5g e 68,4g no regime BS, respectivamente).

Tonel (2009) num ensaio em leitões obteve resultados semelhantes aos registados, apresentando os animais do regime BS um maior peso do baço, um menor peso do intestino delgado e intestino grosso vazios e um menor comprimento do segundo.

Quanto ao peso do fígado, trata-se de um resultado imprevisto. De acordo com Aiello *et al.* (1989) que estudaram o efeito do butirato nos hepatócitos dos ruminantes, o propionato é o principal precursor da glicose nos ruminantes, mas este pode ser inibido na presença do butirato, isto é, o butirato vai actuar na fase inicial do metabolismo dos AGV, que é o transporte através da membrana plasmática inibindo assim, a passagem do propionato. Portanto, vai influenciar o funcionamento do fígado pois vai inibir a síntese hepática de glicose. No entanto, este estudo refere-se a ruminantes e não a monogástricos, se se aplicará também aos segundos é uma incógnita pelo que seriam necessários mais estudos dirigidos para essa área, de forma a comprovar a razão porque o fígado dos animais submetidos a suplementação com BS é de dimensões menores quando em comparação com os animais do regime CTR.

Quadro 10. Efeito da adição do Butirato de Sódio na carcaça e no desenvolvimento do aparelho digestivo do coelho (g) e em proporção com o PV do animal (g / kg de PV).

	Controlo	Butirato	P
Peso Vivo	1111,7	1052,5	NS
Peso de Carcaça	547,5	524,8	NS
Aparelho Digestivo Cheio	347,4	330,1	NS
Fígado	65,7	53,5	0,005
Estômago cheio	68,7	69,3	NS
Estômago Vazio	15,8	14,5	NS
Ceco Cheio	87,9	86,8	NS
Ceco Vazio	16,1	15,5	NS
Intestino Delgado	72,1	68,4	NS
Em proporção (g/kg de PV)			
Rendimento em Carcaça	49,1	49,8	NS
Aparelho Digestivo Cheio	314,0	316,1	NS
Fígado	59,2	50,4	0,006
Estômago cheio	62,3	66,0	NS
Estômago Vazio	14,2	13,7	NS
Ceco Cheio	80,0	84,3	NS
Ceco Vazio	14,6	15,1	NS
Intestino Delgado	65,4	65,8	NS

5. Análise das Mucosas Intestinais

No Quadro 11 estão registados os resultados obtidos na análise das mucosas intestinais dos animais. De acordo com estes, não se observaram efeitos da adição de BS na altura (486,2 μm CTR vs 529,2 μm BS no duodeno; 417,7 μm CTR vs 364,8 μm BS no jejuno; 357,3 μm CTR vs 341,6 μm BS no íleo) e largura das vilosidades (112,3 μm CTR vs 114,2 μm BS no duodeno; 121,5 μm CTR vs 110,7 μm BS no jejuno; 109,5 μm CTR vs 101,9 μm BS no íleo) em nenhum dos locais do intestino. No entanto, verificaram-se efeitos

significativos ($P < 0,001$) a nível da profundidade das criptas, apresentando sempre o regime BS valores mais elevados. Este aumento reflecte uma maior maturação da mucosa e uma secreção de muco mais intensa por parte das criptas (Guilloteau *et al.*, 2009). Verificaram-se ainda diferenças significativas na relação entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas no jejuno e íleo, apresentando os animais do regime CTR uma relação mais elevada do que os do BS (4,7 CTR vs 2,7 BS e 4,1 CTR vs 3,1 BS respectivamente no jejuno e íleo). Quanto maior a relação altura das vilosidades/profundidade das criptas, ou seja, quanto mais compridas forem as vilosidades e menos profundas forem as criptas, melhor será a absorção de nutrientes e menores serão as perdas energéticas com a renovação celular (Li, 1991), no entanto, o que se verificou neste ensaio foi um decréscimo nesta relação, que poderá ter levado a uma menor área de absorção para os animais suplementados.

Resultados semelhantes aos recolhidos neste estudo foram obtidos por Manzanilla *et al.* (2006), num ensaio já referido, embora apenas com efeitos significativos no aumento da profundidade das criptas do duodeno, já Tonel (2009) apenas verificou diferenças significativas a nível da largura das vilosidades. Pelo contrário, Kotunia *et al.* (2004) observaram aumentos em todos os segmentos do intestino delgado, tanto na altura das vilosidades como na profundidade das criptas, ao adicionarem butirato de sódio em dietas para leitões, Carraro *et al.* (2005) não registaram diferenças entre os coelhos suplementados com BS e os que ingeriram um regime CTR. A relação Vilosidades:Criptas (V:C) no trabalho agora apresentado foi menor no jejuno e no íleo de modo semelhante ao registado pelos autores já anteriormente referidos (Manzanilla *et al.*, 2006). Gálfi e Bokori (1990) verificaram uma melhoria significativa na altura das vilosidades do íleo, sendo esta a única área do intestino estudada por estes autores, mas esta melhoria não se verificou na profundidade das criptas.

Leeson *et al.* (2005), utilizando uma suplementação de 0,2% de ácido butírico em frangos não observaram diferenças significativas, nem na altura das vilosidades nem na profundidade das criptas, no entanto, estes autores apenas recolheram amostras do duodeno, considerando que o ácido butírico livre é absorvido muito rapidamente na zona superior do tracto digestivo (Bolton e Dewar, 1965).

Embora no presente ensaio não se tenha obtido aumentos na altura das vilosidades que sejam significativos, observando-se apenas uma ligeira melhoria no duodeno, este aumento poderá levar a uma ampliação da área de absorção do intestino, o que vai influenciar positivamente os processos de transporte de nutrientes e a sua absorção (Schöner, 2001; Cromwell, 2001).

Quadro 11. Efeito do Butirato de Sódio na morfologia intestinal.

Índices	Duodeno			Jejuno			Íleo		
	Controlo	Butirato	P	Controlo	Butirato	P	Controlo	Butirato	P
Altura das vilosidades (μm)	486,2	529,2	NS	417,7	364,8	NS	357,3	341,6	NS
Largura das vilosidades (μm)	112,3	114,2	NS	121,5	110,7	0,151	109,5	101,9	NS
Profundidade das criptas (μm)	87,2	113,1	<0,001	91,6	130,1	<0,001	87,9	112,8	<0,001
Relação Vilosidade:Cripta	5,5	4,7	0,139	4,7	2,7	<0,001	4,1	3,1	0,044

Isto vai permitir ao animal uma maior utilização destes nutrientes, o que levará a um melhor índice de conversão e de aproveitamento dos alimentos e como efeito a um maior aumento de peso.

O facto de não se ter verificado uma acção benéfica do BS sobre as vilosidades pode dever-se ao facto dos animais só terem sido suplementados com este aditivo durante 15 dias, que corresponderam ao período pós-desmame e, como já foi observado neste período as vilosidades tendem a encurtar devido à alteração de alimentação e a outros factores associados ao desmame (Chiquieri *et al.*, 2007).

O butirato pode ainda melhorar a proliferação, diferenciação e maturação e reduzir a apoptose dos enterócitos normais, efeitos já verificados por Sengupta *et al.* (2006), o mesmo não se verificou nos nossos resultados, uma vez que não houve melhoria na altura das vilosidades, mas Guilloteau *et al.* (2009) que avaliaram a taxa de proliferação dos enterócitos obtiveram um aumento desta taxa na parte superior do jejuno e uma tendência de melhoria nas criptas do duodeno quando adicionaram 0,3% de BS no leite fornecido a vitelos.

5.1 Contagem de Coccídias

Após observar os cortes histológicos para medição das vilosidades e criptas notou-se a presença de coccídias e para averiguar se o BS afectava ou não a presença destes microrganismos procedeu-se à sua contabilização. A análise estatística deste procedimento encontra-se no Quadro 12.

Nestes resultados comprovamos que houve diferenças significativas na presença de coccídias no íleo (1,64 CTR vs 7,12 BS), havendo também uma tendência para um maior número de coccídias no duodeno e no jejuno. Embora não haja uma justificação pelo qual isso ocorreu podemos especular sobre o assunto. Dibner e Buttin (2002) referem que embora não seja comum encontrar a presença de antibióticos quando há adição de ácidos orgânicos, outros agentes antimicrobianos como as substâncias coccidiostáticas normalmente estão presentes. Estas substâncias vão exercer o seu próprio efeito na microflora podendo tornar o efeito do ácido orgânico redundante. Neste ensaio o BS que foi adicionado pode ter afectado o coccidiostático que estava presente na suplementação mineral e vitamínica.

Apesar desta explicação parecer a mais plausível, Claus *et al.* (2007) ao adicionarem butirato de cálcio revestido em gordura observaram que comparado com os outros segmentos do intestino, o jejuno parecia ser privilegiado aquando da absorção do butirato. Além disso, a degradação da camada que reveste o butirato é um processo gradual, o que

pode levar a supor que no ensaio destes autores o butirato teria com alvo o jejuno. Tal pode também ter ocorrido no nosso ensaio, o BS pode ter-se degradado no duodeno e jejuno, não chegando ao íleo, ou chegando em quantidades reduzidas tendo aí um menor efeito, pois embora não se verifiquem diferenças significativas nos outros dois segmentos do intestino existe uma tendência para que as coccídias também aí apareçam em maior número.

É ainda de referir que a presença destes microrganismos ao competirem com os animais pelos nutrientes ingeridos podem ter impedido um maior crescimento dos animais do regime BS.

Quadro 12. Efeito da adição do Butirato de Sódio na proliferação de Coccídias.

	Duodeno	Jejuno	Íleo
Controlo	0,88	1,48	1,64
Butirato	5,10	3,82	7,12
P	NS	NS	0,055

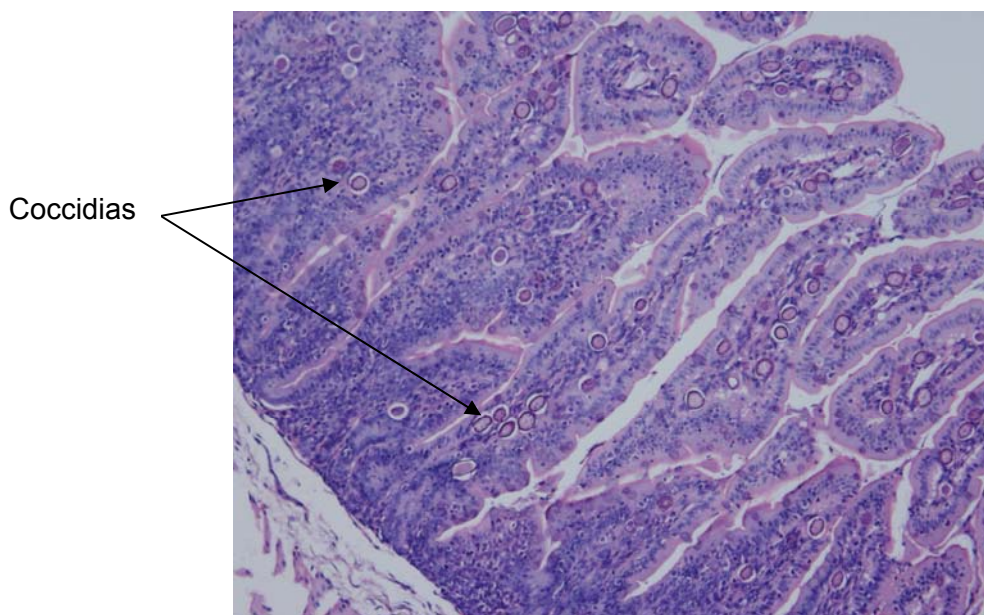


Figura 7. Corte histológico do duodeno (objectiva de 4x) que permite a observação das coccídias presentes no intestino delgado de um animal do regime BS, utilização do microscópio Olympus BX 511.

V. Conclusão

Nas nossas condições experimentais, a adição de Butirato de Sódio na alimentação de coelhos no período de crescimento e engorda apenas afectou positivamente o Índice de Conversão, através de uma menor ingestão de alimento. Este facto poderá ser importante, uma vez que a alimentação dos animais é o factor de produção mais oneroso.

VI. Referências Bibliográficas

- AARESTRUP F.M., 2002. Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. *Working Papers for the WHO International Review Panels Evaluation, Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production*, 6-12.
- ABECIA L., Fondevila M., Balcells J., Belenguer A., 2005. Effect of fumaric acid on diet digestibility and the caecal environment of growing rabbits. *Animal Research*, 54: 493-498.
- ABOUL-ELA S., ABD El-Galil K., Ali F.A., 2000. Effect of dietary fiber and energy levels on performance of post-weaning rabbits. *World Rabbit Science*, 8 (suppl.1): 61-75 .
- AIELLO R.J., Armentano L.E., Bertics S.J., Murphy A.T., 1989. Volatile fatty acid uptake and propionate metabolism in ruminant hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 72: 942-949.
- AMORIM M.J.A.A.L., Amorim Júnior A.A., Silva Júnior V.A., Villarouco F.M.O., Henrique V.V.A., 2002. Longitud total del intestino de conejos sin raza definida (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista Chilena de Anatomía*, vol.20, 2: 181-183.
- ARGENZIO R.A., Meuten D.J., 1991. Short-chain fatty acids induce reversible injury of porcine colon. *Digestive Diseases and Sciences*, vol.36, 10: 1459-1468.
- AVIVI-GREEN C., Polak-Charcon S., Madar Z., Schwartz B., 2002. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *The Journal of Nutrition*, 132: 1812-1818.
- BEST P., 2000. Adding acids to swine diets. *Feed Management*, vol.51, 5:19-22. Citado por Doyle M.E., 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. *Food Research Institute Briefings*, 1-17.
- 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. *Journal of Animal Science*, 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. *Journal of Animal Science*, 85:1184-1191.

- BLANK R., Mosenthin R., Sauer W.C., Huang S., 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 77: 2974-2984.
- BOND J.H., Levitt M.D., 1976. Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man. *The Journal of Clinical Investigation*, 57: 1158-1164.
- BOLTON W., Dewar W.A., 1965. The digestibility of acetic, propionic and butyric acids by the fowl. *British Poultry Science*, vol.6, 2: 103-110.
- BOULAHROUF A., Fonty G., Gouet Ph., 1991. Establishment, counts, and identification of the fibrolytic microflora in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current Microbiology*, 22: 21-25.
- BRIENS C., Arturo-Schaan M., Grenet L., Robert F., 2005. Effet d'extraits de plantes sur le statut antioxydant et la mortalité de lapins en engraissement. *Procedimentos das 11èemes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, França, 217-220.
- BUGAUT M., 1987. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol.86B, 3: 439-472.
- BÜHLER K., Wenk C., Broz J., Gebert S., 2006. Influence of benzoic acid and dietary protein level on performance, nitrogen metabolism and urinary pH in growing-finishing pigs. *Archives of Animal Nutrition*, vol.60, 5: 382-389.
- BURNELL T.W., Cromwell G.L., Stahly T.S., 1988. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 66: 1100-1108.
- BUTEL M.J., Roland N., Hibert A., Popot F., Favre A., Tessedre A.C., Bensaada M., Rimbault A., Szylit O., 1998. Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 47: 391-399.
- BÜNZEN S., 2006. Capacidade tampão das rações para suínos. *Boletim Técnico, Serrana Nutrição Animal*.
- CAÑAS-RODRIGUEZ A., Smith H.W., 1966. The Identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. *Biochemical Journal*, 100: 79-82.
- CANIBE N., Engberg R.M., Jensen B.B., 2001. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum, Denmark.

CARRARO L., Xiccato G., Trocino A., Radaelli G., 2005. Dietary supplementation of butyrate in growing rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 4 (suppl.2): 538-540.

CASEWELL M., Friis C., Marco E., McMullin P., Philips I., 2003. The european ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 159-161.

CASTILLO M., Martín-Orúe S.M., Manzanilla E.G., Badiola I., Perez J.F., Gasa J., 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84: 2725-2734.

CE: COMUNIDADE EUROPEIA, 2003. Regulamento (CE) N.º1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal (Texto relevante para efeitos do EEE). *Jornal Oficial da União Europeia*, L 268/29 - L 268/43.

CERA K.R., Mahan D.C., Cross R.F., Reinhart G.A., Whitmoyer R.E., 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *Journal of Animal Science*, 66: 574-584.

CHAVEERACH P., Keuzenkamp D.A., Urlings H.A.P., Lipman L.J.A., van Knapen F., 2002. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry Science*, 81: 621-628.

CHAVEERACH P., Keuzenkamp D.A., Lipman L.J.A., van Knapen F., 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science*, 83: 330-334.

CHERRINGTON C.A., Hinton M., Pearson G.R., Chopra I., 1991. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrana perturbation. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 161-165.

CHIQUIERI J., Soares R.T.R.N., Hurtado Nery V.L., Carvalho E.C.Q., Costa A.P.D., 2007. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais em suínos alimentados com adição de próbiotico, prébiotico e antibiótico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, vol.8, 2: 97-104.

CLAUS R., Günthner D., Letzguß H., 2007. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91: 312-318.

CLAUSEN M.R., Bonnén H., Mortensen P.B., 1991. Colonic fermentation of dietary fiber to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut*, 32: 923-928.

CORTEZ S., Brandenburger H., Greuel E., Sundrum A., 1992. Investigations of the relationship between feed and health status on the intestinal flora of rabbits (em alemão). *Tierärztl. Umschau*, 47: 173-180. Citado por Skřivanová V., Marounek M., 2007. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 52: 70-72.

CROMWELL G.L., 2001. Antimicrobial and promicrobial agents. Em Lewis A.J., Southern L.L.. *Swine Nutrition*, Second edition. CRC Press LLC, USA, 401-426.

CUMMINGS J.H., Englyst H.N., 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61 (suppl): 938S-945S.

DASKIRAN M., Teeter R.G., Vanhooser S.L., Gibson M.L., Roura E., 2004. Effect of dietary acidification on mortality rates, general performance, carcass characteristics, and serum chemistry of broilers exposed to cycling high ambient temperature stress. *The Journal of Applied Poultry Research*, 13: 605-613.

DE BLAS J.C., Santomá G., Carabaño R., Fraga M.J., 1986. Fiber and starch levels in fattening rabbit diets. *Journal of Animal Science*, 63: 1897-1904.

DE BLAS C., 1984. *Alimentación del conejo*. Madri: Mundi-Prensa, 215. Citado por Michelan A.C., Scapinello C., Natali M.R., Furlan A.C., Sakaguti E.S., Faria H.G., Santolin M.L., Fernandes A.B., 2002. Utilização de Probiótico, Ácido Orgânico e Antibiótico em Dietas para Coelho em Crescimento: Ensaio de Digestibilidade, Avaliação da Morfometria Intestinal e Desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.31, 6: 2227-2237.

DIBNER J.J., Buttin P., 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11:453-463.

DIEBOLD G., Eidelsburger U., 2006. Acidification of diets as an alternative to antibiotic growth promoters. Em Barug D., de Jong J., Kies A.K., Verstegen M.W.A. (Eds.), *Antimicrobial Growth Promoters*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 311-327.

DOYLE M.E., 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. *Food Research Institute Briefings*, 1-17.

EIBEN Cs., Gippert T., Gódor-Surmann K., Kustos K., 2008. Feed additives as they affect fattening performance of rabbits. *9th World Rabbit Congress*, 10-13 Junho, Verona, Itália, 625-630.

EIDELSBURGER U., Kirchgessner M., Roth F.X., 1992. Zum Einfluß von Ameisensäure, calciumformiat und natriumhydrogencarbonat auf pH-Wert, trockenmassegehalt, konzentrationen na carbonsäuren und ammoniak in verschiedenen segmenten dês gastrointestinaltraktes. 8. Mitteilung: untersuchungen zur nutritiven wirksamkeit von organischen säuren in der ferkelaufzucht. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 68: 20-32. Citado por Diebold G., Eidelsburger U., 2006. Acidification of diets as na alternative to antibiotic growth promoters. Em Barug D., de Jong J., Kies A.K., Verstegen M.W.A. (Eds.), *Antimicrobial Growth Promoters*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 311-327

EMALDI O., Crociani F., Matteuzzi D., Proto V., 1979. A note on the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content soft and hard faeces. *The Journal of applied bacteriology*. 46: 169-172.

FALCÃO E CUNHA L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J., Mourão J.L., 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Science*, 15:127-140.

FALCÃO E CUNHA, L., 2000. Fisiologia digestiva do Coelho. Aspectos mais relevantes. *I Jornadas Internacionais de Cunicultura - Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos*, pp 49-69.

FRANCO L.D., Fondevilla M., Lobera M.B., Castrillo C., 2005. Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutricion*, 89: 88-93.

FULLER R., 1989. Probiotics in man and animals. A Review. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

GÁLFI P., Bokori J., 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium *n*-Butyrate. *Acta Veterinaria Hungarica*, 38 (1-2): 3-17.

GALLOIS M., Gidenne T., Fortun-Lamothe L., Le Huerou-Luron I., Lallès J., 2005. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Reproduction Nutrition Development*, 45: 109-122.

GAMA N.M., Oliveira M.B., Santin E., Junior A.B, 2000. Ácidos Orgânicos em rações de poedeiras comerciais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, 3: 499-502.

GAUTHIER R., 2002. The mode of action of acidifiers and the interest they generate in the growing-finishing phase. *Current Developments in Pig Production*, Jefe Nutrition Inc..

GIDENNE T., 1992. Effect of fibre level, particle size and adaptation period on digestibility and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbits. *British Journal of Nutrition*, 67: 133-146.

GIDENNE T., 1997. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Sciences*, 51: 73-88.

GIESTING D.W., Easter R. A., 1985. Response of starter pigs supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids. *Journal of Animal Science*, 60:1288-1294.

GIPPERT T., Bersényi A., Szabó L., Farkas ZS., 1996. Development of novel feed concentrates supplemented with salinomycin and lactosacc for growing rabbit nutrition in small scale farms. *Proceedings of 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, França, vol.1: 187-190.

GOUET Ph., Fonty G., 1973. Évolution de la microflore digestive du lapin holoxénique de la naissance au sevrage. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 13: 733-735.

GRAVESEN A., Diao Z., Voss J., Budde B.B., Knøchel S., 2004. Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by D- and L-lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 528-532.

GUILLOTEAU P., Zabielski R., David J.C., Blum J.W., Morisset J.A., Biernat M., Woliński J., Laubitz D., Hamon Y., 2009. Sodium-butyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young calves. *American Dairy Science*, 92: 1038-1049.

HALM M., Hornbæk T., Arneborg N., Sefa-Dedeh S., Jespersen L., 2004. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 97-103.

HANSEN C.F., Riis A.L., Bresson S., Højbjerg O., Jensen B.B., 2007. Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science*, 108: 206-209.

HULLAR I., Fekete S., Szigeti G., Bokori J., 1996. Sodium butyrate as a natural growth promoter for rabbits. *6th World Rabbit Congress*, Toulouse, vol. 2, 175-179.

HUNTER D.R., Segel I.H., 1973. Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *Journal of Bacteriology*, vol.113, 3: 1184-1192.

IBA A.M., Berchieri Jr A., 1995. Studies on the use of a formic acid-propionic acid mixture (Bio-add™) to control experimental *Salmonella* infection in broiler chickens. *Avian Pathology*, 34: 303-311.

JIN L., Reynolds L.P., Redmer D.A., Caton J.S., Crenshaw J.D., 1994. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation, and morphology in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 72: 2270-2278.

JUKES T.H., 1977. The history of the antibiotic growth effect. *Federation Proceedings*, 37: 2514–2518. Citado por Knarreborg A., Miquel N., Granli T., Jensen B.B., 2002. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 99: 131-140.

JUNQUEIRA L. C., Carneiro J., 2004. *Histologia Básica, décima edição*. Guanabara Kougan. Rio de Janeiro, 299-314.

KEELAN M., Walker K., Thompson A.B.R., 1985. Intestinal morphology, marker enzymes and lipid content of brush border membranes from rabbit jejunum and ileum: effect of aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 31: 49-68.

KEMME P.A., Jongbloed A.W., Mroz Z., Kogut J., Beynen A.C., 1999. Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytase and lactic acid levels. 1. Apparent ileal digestibility of amino acids. *Livestock Production Sciences*, 58: 107-117.

KERMAUNER A., Struklec M., 1996. Addition of robiotic to feeds with different energy and ADF content in rabbits. 1. Effect on the digestive organs. *World Rabbit Science*, vol.4, 4: 187-193.

KERMAUNER A., Struklec M., Logar R.M., 1996. Addition of robiotic to feeds with different energy and ADF content in rabbits. 2. Effect on microbial metabolism in the caecum. *World Rabbit Science*, vol.4, 4: 195-200.

KHACHATOURIANS G.G., 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, vol.159, 9: 1129-1136.

- KIEN C.L., Murray R.D., Qualman S.J., Marcon M., 1999. Lactulose feeding in piglets. A model for persistent diarrhea and colitis induced by severe sugar malabsorption. *Digestive Diseases and Sciences*, vol.44, 7: 1476-1484.
- KLASING K.C., 1998. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science*, 77: 1119-1125.
- KLUGE H., Broz J., Eder K., 2006. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90: 316-324.
- KNARREBORG A., Miquel N., Granli T., Jensen B.B., 2002. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 99: 131-140.
- KNUDSEN K.E.B., Serena A., Canibe N., Juntunen K.J., 2003. New insight into butyrate metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 81-86.
- 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. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol.55, suppl.2: 59-68.
- LAPLACE J. P., 1978. Le transit digestif chez les monogastriques. III. - Comportement (prise de nourriture - caecotrophie), motricité et transit digestifs, et pathogénie des diarrhées chez le Lapin. *Annales de Zootechnie*, 27: 225-265.
- LEBAS F., Coudert P., de Rochambeau H., Thébault R.G., 1997. *The Rabbit: husbandry, health and production*. FAO Animal Production and Health Series, n°21. Roma, Itália.
- LEBAS F., 2007. *Méthodes et techniques d'Élevage du Lapin: Historique de la domestication et des méthodes d'élevage*. Disponivel em: <http://www.cuniculture.info/Docs/Elevage/Histori-01.htm>.
- LEESON S., Namkung H., Antongiovanni M., Lee E.H., 2005. Effect of butiric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poultry Science*, 84: 1418-1422.
- LI D.F., Nelssen J.L., Reddy P.G., Blecha F., Klemm R., Goodband R.D., 1991. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 69: 4062-4069.

LICOIS D., 2004. Domestic rabbit enteropathies. *Proceedings of 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico*, 385-403.

LIN J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W., 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.62, 9: 3094-3100.

MAERTENS L., Štruklec M., 2006. Technical note: preliminary results with a tannin extract the performance and mortality of growing rabbits in an enteropathy infected environment. *World Rabbit Science*, 14: 189-192.

MAIORKA A., 2006. Qualidade intestinal em frangos. Universidade Federal do Paraná, 1-18.

MANZANILLA E.G., Nofrarias M., Anguita M., Castillo M., Perez J.F., Martín-Orúe S.M., Kamel C., Gasa J., 2006. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84: 2743-2751.

MAROUNEK M., Vovk S.J., Skřivanová V., 1995. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition*, 73: 463-469.

MARTY J., Vernay M., 1984. Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hind-gut of the rabbit. *British Journal of Nutrition*, 51: 265-277.

MENTSCHHELL J., Claus R., 2003. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and shift to the stem cell compartment. *Metabolism*, vol.52, 11: 1400-1405.

MICHELAN A.C., Scapinello C., Natali M.R., Furlan A.C., Sakaguti E.S., Faria H.G., Santolin M.L., Fernandes A.B., 2002. Utilização de Probiótico, Ácido Orgânico e Antibiótico em Dietas para Coelhos em Crescimento: Ensaio de Digestibilidade, Avaliação da Morfometria Intestinal e Desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.31, 6: 2227-2237.

MOSENTHIN R., Sauer W.C., Ahrens F., de Lange C.F.M., Bornholdt U., 1992. Effects of dietary supplements of propionic acid, siliceous earth or a combination of these on the energy, protein and amino acid digestibilities and concentrations of microbial metabolites in the digestive tract of growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 37: 245-255.

MROZ Z., Jongbloed A.W., Partanen K.H., Vreman K., Kemme P.A., Kogut J., 2000. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. *Journal of Animal Science*, 78: 2622-2632.

MROZ Z., Koopmans S-J, Bannink A, Partanen K, Krasucki W, Øverland M, Radcliffe S., 2006. Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in non-ruminants. Em Mosenthin R, Zebrowska T (editors). *Biology of the intestine*. Amsterdão: Elsevier; 81–133. Citado por 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. *The Journal of Nutrition*, 138: 1426-1431.

NRC: NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1980. *The effects on human health of subtherapeutic use of antimicrobials in animal feeds*. National Academy of Sciences, Washington, USA.

ØVERLAND M., Granli T., Kjos N.P., Fjetland O., Steien S.H., Stokstad M., 2000. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 78: 1875-1884.

ØVERLAND M., Kjos N.P., Borg M., Skjerve E., Sorum H., 2007. Organic acids in diets for entire male pigs. *Livestock Science*, 109: 170-173.

ØVERLAND M., Kjos N.P., Borg M., Skjerve E., Sorum H., 2008. Organic acids in diets for entire male pigs: Effects on skatole level, microbiota in digesta, and growth performance. *Livestock Science*, 115: 169-178.

PARKER D.S., 1976. The measurement of production rates of volatile fatty acids in the caecum of the conscious rabbit. *British Journal of Nutrition*, 36: 61-70.

PARTENEN K.H., Mroz Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, 12: 117-145.

PARTENEN K., 2001. Organic acids – their efficacy and modes of action in pigs. Em Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E.. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press, Reino Unido, 201-217.

PAULICKS B.R., Roth F.X., Kirchgessner M., 2000. Effects of potassium diformate (Formi® LHS) in combination with different grains and energy densities in the feed on growth performance of weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 84: 102-111.

PENZ Jr, A.M., 1991. Hipótesis que justifican el uso de ácidos orgánicos en las dietas para aves e cerdos. *Avicultura Profesional*, 9: 46. Citado por Gama N.M., Oliveira M.B., Santin E., Junior A.B, 2000. Ácidos Orgánicos em rações de poedeiras comerciais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, 3: 499-502.

PINHEIRO V.M.C., Mourão J.L.M., 2006. *Alimentação do Coelho*. Série Didáctica Ciências Aplicadas 302. Sector Editorial dos SDE, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

PINHEIRO V., Gidenne T., Falcão e Cunha L., 2001. Effect of age on bacterial fibrolytic activity of caecal flora of rabbit.

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. *Italian Journal of Animal Science*, 1: 35-41.

PLAYNE M. J., McDonald P., 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17: 264-268.

PRESSER K.A., Ratkowsky D.A., Ross T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.63, 6: 2355-2360.

RADCLIFFE J.S., Zhang Z., Kornegay E.T., 1998. The effect of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 76: 1880-1886.

RADECKI S.V., Juhl M.R., Miller E.R., 1988. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. *Journal of Animal Science*, 66: 2598-2605.

RAVINDRAW V., Kornegay E.T., 1993. Acidification of weaner pig diets: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62: 313-322.

ROEDIGER W.E., 1980 (a). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21: 793-798.

ROEDIGER W.E.W., 1980 (b). The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *The Lancet*, 2: 712-715.

ROTH F.X., 2000. Ácidos orgánicos en nutrición porcina: eficacia y modo de acción. *Avances en nutrición y alimentación animal: XVI Curso de Especialización FEDNA*, 169-181.

RUSSEL J.B., 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 363-370.

SAKATA T., 1987. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *British Journal of Nutrition*, 58: 95-103.

SALMINEN S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J. H., Franck A., Gibson G. R., Isolauri E., Mores M.C., Roberfroid M., Rowland I., 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80 (suppl.1): S147-S171.

SÁNCHEZ H.I., Posadas H.E., Fuente M.B., Laparra V.J.L., Ávila G.E., 2008. El efecto del butirato de sodio en dietas para gallinas sobre el comportamiento productivo y calidad del huevo. *57th WPDC/XXXIII ANECA*.

SAUVANT D., Chapoutot P., Ginger-Reverdin S., Meschy F., 2005. Alimentos compostos e subprodutos para ruminantes. Novos critérios de avaliação de qualidade (II). *Nutrição*, 64-68.

SCAPINELLO C., Faria H.G., Furlan A.C., Michelan A.C., 2001. Efeito do uso de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.30, 4: 1275-1277.

SCHÖNER F.J., 2002. Nutritional effects of organic acids, 55-61.

SENGUPTA S., Muir J.G., Gibson P.R., 2006. Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21: 209-218.

SMITH H.W., 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 90: 495-513.

SKŘIVANOVÁ, V., Marounek, M., 2002. Effects of caprylic acid on performance and mortality of growing rabbits. *Acta Veterinaria Brunensis*, 71: 435-439.

SKŘIVANOVÁ, V., Marounek, M., 2007. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 52: 70-72.

THOMPSON J.L., Hinton M., 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop. *British Poultry Science*, 38: 59-65.

THORNTON J.R., 1981. High colonic pH promotes colorectal cancer. *The Lancet*, vol.317, 8229:1081-1082.

TONEL I.S.P.A., 2009. *Efeito da utilização de Butirato de Sódio na digestibilidade, actividade fermentativa e morfologia intestinal em leitões desmamados*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agrónómica – Agro-Pecuária. Lisboa, Portugal.

TREEM W.R., Ahsan N., Shoup M., Hyams J.S., 1994. Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 18: 159-164.

TSILOYIANNIS V. K., Kyriakis S. C., Vlemmas J., Sarris K., 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, 70: 287-293.

URBAITYTE R., 2009. Use of organic acids in feed and raw materials. *Feed Tech Magazine*, vol.13, 6:10-12.

VAN DER HAGE M.H., 1988. The morphogenesis of the small intestinal mucosa of the rabbit. A stereomicroscopical study. *Proceedings of 4th World Rabbit Science Association*, Budapeste, Hungria, 3: 347–355.

VAN DER KLIS J.D., Jansman A.J.M., 2002. Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastrics: Reality or illusion? Em Blok M.C., Vahl H.A., de Lange L., van der Brook A.E., Hemke G., Hessing M.. *Nutrition and Health of the gastrointestinal tract*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 15-36.

VAN IMMERSEEL F., Fievez V., Buck J., Pasmans F., Martel A., Haesebrouck F., Ducatelle R., 2004. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. *Poultry Science*, 83: 69-74.

VETAGRO®, 2006. Organic acids in piglets feed: the role of diet buffering capacity.

VIAENE J., Verbeke W., 1999. Economic feasibility of the use of feed additives. *Pig Progress*, vol.14, 3:11-14.

VIOLA E.S., Vieira S.L., 2007 (supl.). Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, 4: 1097-1104.

WEBER T.E., Kerr B.J., 2008. Effect of sodium butyrate on growth performance and response to lipopolysaccharide in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 86: 442-450.

YU B., Chiou P.W.S., 1997. The morphological changes of intestinal mucosa in growing rabbits. *Laboratory Animals*, 31: 254-263.

ZI LIN G., Ren Lu H., Wen She R., Guo Xian Z., Yu Ting H., 1996. The effects of BFA on weight gain and coccidiosis in meat rabbits. *Proceedings of 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, France, 3: 73–76.