

**José Miguel Peixinho Martins Ramos**

**Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2019



**José Miguel Peixinho Martins Ramos**

**Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2019

## **Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal**

---

José Miguel Peixinho Martins Ramos

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## Sumário

Um dos maiores desafios ao nível da exploração animal intensiva é a procura constante de condições que melhorem os índices económicos e zootécnicos, o que gerou uma certa dependência no que concerne ao uso de promotores de crescimento.

Durante muito anos, desde 1950, o recurso a antibióticos como promotores de crescimento em explorações pecuárias foi uma prática corrente. Contudo, a utilização abusiva destes compostos tornou-se uma preocupação devido à eminente possibilidade de risco para a saúde, tanto para a saúde humana como para a saúde animal, devido ao aparecimento de resistências, somando, ainda, os problemas de contaminação ambiental.

Nesta matéria, um dos precedentes positivo adotado pela União Europeia, no ano de 2006, foi a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento. A simples supressão do uso de antibióticos com esta finalidade traria grandes consequências negativas e, com isto, existiu a necessidade de encontrar alternativas que culminem em resultados similares ou superiores aos antibióticos. Alguns exemplos desses substitutos incluem os ácidos orgânicos, os probióticos, os prebióticos, os simbióticos, as enzimas exógenas e os óleos essenciais.

A presente dissertação tem como objetivo apresentar o estado da arte dos estudos que comprovam o potencial das alternativas referidas para serem usados como promotores de crescimento e a sua contribuição para a melhoria na saúde dos animais. Adicionalmente, a ação sinérgica entre as várias alternativas encontra-se também reportada em alguns estudos de produção animal.

**Palavras-chave:** Promotores de crescimento; Ácidos orgânicos; Probióticos; Prebióticos; Simbióticos; Enzimas exógenas; Óleos essenciais;

**Abstract**

In the intensive animal exploitation, one of the biggest challenges is the continuous search for conditions that improve economic and zootechnical indices, which has created some dependence on the use of growth promoters.

For many years, since 1950, the use of antibiotics as growth promoters in livestock has been a common practice. However, the misuse of these compounds has become a concern due to the imminent prospect of risk to both human and animal health, the emergence of resistance and problems of environmental contamination.

In this regard, one of the positive precedents adopted by the European Union, in 2006, was the ban on antibiotics as growth promoters in animal feed. The simple suppression of the use of antibiotics for this purpose would have major negative consequences and, therefore, it was necessary to find alternatives that result in similar or superior results to antibiotics as growth promoters. Examples of such substitutes include organic acids, probiotics, prebiotics, symbiotics, exogenous enzymes and essential oils.

This dissertation aims to present the state of the art of studies that prove the potential of the alternatives referred as growth promoters and their contribution to the improvement of animal health. Additionally, the synergistic action between the various alternatives is also reported in some animal production studies.

**Keywords:** Growth promoters; Organic acids; Probiotics; Prebiotics; Symbiotics; Exogenous enzymes; Essential oils

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu pai, pois devo-lhe o facto de concluir o curso em Ciências Farmacêuticas, no meio das minhas indecisões foi ele que me aconselhou a tirar este curso. Apesar de ter estado presente apenas no 1º ano do meu curso, quero dedicar-lhe esta dissertação por ser um dos seus sonhos ver-me formado e com responsabilidade. Escolhi este tema porque quis alertar para o uso abusivo de antibióticos em animais de exploração.

À minha mãe, um enorme agradecimento por tudo o que fez por mim, por todo o apoio, preocupação e amizade que tão úteis foram nestes últimos anos. Obrigado pela educação e pelos conselhos que me deste até hoje.

À minha avó Mi, um beijinho e uma palavra de agradecimento é pouco para tudo o que me ensinou e proporcionou.

À minha irmã pela paciência, ajuda e amizade que teve comigo ao longo destes anos, pelos conselhos que sempre necessitei.

À minha orientadora, pela simpatia, paciência, e dedicação que teve comigo e com o meu trabalho. Foi realmente uma grande ajuda para que conseguisse encerrar esta etapa.

Aos meus padrinhos e à Cristina, por todo o cuidado e atenção que tiveram comigo.

A toda a minha família que me apoiou de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este meu objetivo fosse concluído com sucesso.

Aos meus amigos, Rui Soares, Francisco Carvalho, Renato Rodrigues, Fabiana Almeida, Margarida Gonçalves, Mafalda Santos, Inês Cerca por toda a amizade e ajuda nos piores e nos melhores momentos ao longo destes anos.

## Índice

|   |      |
|---|------|
| Sumário.....  | i    |
| Abstract.....   | ii   |
| Agradecimentos.....   | iii  |
| Índice.....   | iv   |
| Índice de figuras.....  | vii  |
| Índice de tabelas.....  | viii |
| Índice de abreviaturas.....   | ix   |
| I. Introdução.....  | 1    |
| II. Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento.....          | 6    |
| II.1. Ácidos orgânicos.....   | 6    |
| II.1.1. Inibição de bactérias patogênicas.....                                | 8    |
| II.2. Probióticos.....  | 18   |
| II.2.1. Competição dos probióticos por locais de ligação.....                 | 19   |
| II.2.2. Produção de substâncias antimicrobianas.....                          | 20   |
| II.2.3. Estimulação do sistema imunitário.....                                | 21   |
| II.2.4. Aumento do efeito nutricional.....                                    | 22   |
| II.2.5. Reforço da barreira epitelial.....                                    | 22   |
| II.3. Prebióticos.....  | 24   |
| II.3.1. Mecanismos de ação dos prebióticos.....                               | 26   |
| II.3.1.1. Interação com as células e o sistema imunológico do hospedeiro..... | 26   |

|  |    |
|--|----|
| Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal     |    |
| II.3.1.2. Modulação da microbiota intestinal do hospedeiro .....                   | 26 |
| II.3.1.3 Fonte energética das células epiteliais intestinais .....                 | 27 |
| II.3.1.4- Bloqueio da adesão das bactérias patogênicas à parede do intestino ..... | 27 |
| .....  | 28 |
| II.3.2 Estudos prebióticos .....   | 28 |
| II.4. Simbióticos .....  | 31 |
| II.5. Enzimas exógenas .....   | 32 |
| II.5.1 Mecanismos de ação enzimas exógenas .....                                   | 33 |
| II.5.1.1 Aumento da digestibilidade dos nutrientes .....                           | 33 |
| II.5.1.2 Eliminação dos polissacarídeos da parede celular .....                    | 34 |
| II.5.1.3 Degradação dos fatores anti-nutricionais .....                            | 34 |
| II.5.1.4 Suplementação de enzimas exógenas em animais jovens .....                 | 35 |
| II.5.1.5 Aumento da solubilidade de polissacarídeos não solúveis .....             | 35 |
| II.6. Óleos essenciais .....   | 36 |
| II.6.1. Mecanismo de ação dos óleos essenciais .....                               | 36 |
| II.6.1.1. Efeito anti-inflamatório .....   | 36 |
| II.6.1.2. Efeito anti-oxidante .....   | 37 |
| II.6.1.3. Efeito antimicrobiano .....  | 37 |
| III. Sinergismo entre os vários promotores de crescimento .....                    | 40 |
| III.1. Sinergismo entre ácidos orgânicos e óleos essenciais .....                  | 40 |
| III.2 Sinergismo entre enzimas exógenas e prebióticos .....                        | 41 |
| III.3 Sinergismo entre ácidos orgânicos e enzimas exógenas .....                   | 42 |

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

|                     |    |
|---------------------|----|
| IV. Conclusão ..... | 43 |
| Referências .....   | 45 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Exemplos de produtos alternativos utilizados como promotores de crescimento na produção animal.....  | 3  |
| <b>Figura 2:</b> Diferentes mecanismos de ação dos ácidos orgânicos como promotores de crescimento na produção animal. ....   | 8  |
| <b>Figura 3:</b> Mecanismo de inibição das bactérias patogênicas pela ação dos ácidos orgânicos.....  | 10 |
| <b>Figura 4:</b> Processo de acidificação estomacal para posterior ativação da pepsina, aumento da absorção proteica e, conseqüente, aumento do crescimento das aves e suínos. .... | 12 |
| <b>Figura 5:</b> Libertação do fósforo inorgânico do fitato através da ação da enzima fitase.   | 16 |
| <b>Figura 6:</b> Mecanismos de ação dos probióticos.....  | 19 |
| <b>Figura 7:</b> Mecanismo de ação dos prebióticos. ....  | 26 |
| <b>Figura 8:</b> Mecanismo de ação do bloqueio da adesão bacteriana à parede intestinal....   | 28 |
| <b>Figura 9:</b> Mecanismos de ação das enzimas exógenas .....  | 33 |

**Índice de tabelas**

**Tabela 1:** Fórmulas e características físico-químicas dos ácidos orgânicos utilizados como acidificantes em rações para suínos ou aves..... 7

**Tabela 2:** Concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais nas várias bactérias..... 38

## Índice de abreviaturas

|                 |   |
|-----------------|---|
| AB -            | Antibiótico(s)  |
| AO -            | Ácidos orgânicos  |
| ATP -           | Trifosfato de adenosina (do inglês, <i>Adenosine triphosphate</i> )   |
| ATPase -        | Adenosinatrifosfatase (do inglês, <i>Adenosine triphosphatase</i> )   |
| Ca-butirato -   | Complexo cálcio-butirato  |
| CMI -           | Concentração Mínima Inibitória  |
| DNA -           | Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> )  |
| EMA -           | Agência Europeia do Medicamento (do inglês, <i>European Medicines Agency</i> )  |
| FAO -           | Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ) |
| FDA -           | Food and Drug Administration  |
| FOS -           | Fruto-oligossacarídeos  |
| GI -            | Gastrointestinal  |
| GOS -           | Galacto-oligossacarídeos  |
| HA -            | Ácido orgânico não dissociado   |
| IFN- $\gamma$ - | Interferão-gama (do inglês, <i>Interferon gamma</i> )   |
| IG -            | Imunoglobulina  |
| IL -            | Interleucina  |
| IMO -           | Isomaltooligossacarídeos  |
| ISAPP -         | <i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>   |
| MOS -           | Mananoligossacarídeos   |

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

- NF-kB - Factor nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear factor-kappa-B*)
- Nrf2 - Fator nuclear (eritróide 2) relacionado com o fator 2 expressão 2 (do inglês, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)
- NSP - Polissacarídeos não amiláceos (do inglês, *Non-starch polysaccharides*)
- NSPases - Enzimas que degradam os polissacarídeos não amiláceos
- OE - Óleos essenciais
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- Ka - Constante de acidez
- SOS - Oligossacarídeos da soja
- TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor beta*)
- TGI - Trato gastrointestinal
- TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*)
- XOS - Xilo-oligossacarídeos

## I. Introdução

No último século, o recurso e a incorporação de promotores de crescimento na ração animal ou na água permitiu melhorar as condições de vida animal. Como consequência deste procedimento, ocorreu um decréscimo de custos relacionado com a alimentação, uma vez que, ao melhorar a digestibilidade das rações, os animais necessitam de menores quantidades de alimento para obter a quantidade de nutrientes necessários, ocorrendo também um aumento no ritmo de crescimento do animal (Angelakis, 2017).

Contudo, alguns compostos utilizados como promotores de crescimento na produção animal, mais concretamente antibióticos (AB), anabolizantes,  $\beta$ -agonista, têm sido alvo de bastante polémica devido às consequências negativas, diretas ou indiretas, que a sua utilização pode provocar na saúde do homem, na saúde do próprio animal e no meio ambiente. O uso de AB na exploração pecuária tem assumido dimensões preocupantes dado a quantidade de AB, a diversidade de moléculas utilizadas, e a via de administração (oral) prolongada em concentrações subterapêuticas.

Em 1998, Boatman estimou que foram utilizados, à escala mundial, 27.000 toneladas de AB para a saúde animal. Destes, 25 % foram usados pelos países da União Europeia, sendo 50% destinados a fins terapêuticos, 25 % incorporados na alimentação com o objetivo de promover o crescimento, e 25 % usados na prevenção da coccidiose em frangos e perus de carne, como aditivos alimentares ionóforos. De acordo com um relatório publicado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês *European Medicines Agency*), em outubro de 2019, estimou-se que, entre 2011 e 2017, as vendas de AB para uso veterinário, em 31 países da União Europeia, tenham reduzido em 32%. Os resultados demonstram que, as campanhas acerca do uso restrito de AB nos animais, promovidas pela União Europeia, estão a ter um efeito positivo (EMA, 2019).

Os efeitos dos AB na melhoria do desenvolvimento dos animais de produção, mais concretamente, a ação dos agentes anti-infecciosos como promotores de crescimento, foram descobertos, quando Moore *et al.* (1946) observaram que as aves alimentadas com uma ração contendo estreptomicina ou succinilsulfatiazol apresentavam um aumento do seu peso. Esta observação, naquele momento, passou despercebida. Posteriormente, demonstrou-se que os produtos de fermentação, como o estrume e o suco ruminal, tinham um efeito promotor de crescimento nas aves, classificando-os como “fatores de

crescimento não identificados”. Verificou-se que estes produtos serviam também para combater a anemia, pelo que se suponha tratar-se da presença de vitamina B<sub>12</sub>. Contudo, muitos estudos de alimentação realizados com produtos de fermentação indicavam que, para além desta vitamina, deveriam existir outras substâncias. Esta hipótese foi confirmada em porcos, em 1950, usando produtos de fermentação de *Streptomyces aureofaciens*. A partir deste momento, iniciou-se a utilização dos AB para aumentar o ritmo de crescimento dos animais.

Durante anos, os AB foram utilizados em doses subterapêuticas, incluídos nas rações animais, para promover o crescimento, melhorar a digestibilidade das rações e prevenir infeções (Castanon, 2007; Engberg *et al.*, 2000).

Contudo, com o passar dos anos, o recurso excessivo ao uso de AB, quer nos animais, em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento, e em situações de profilaxia de infeções, quer em humanos, tem gerado alguns aspetos negativos, nomeadamente (Forgetta *et al.*, 2012): a presença residual de AB em alguns produtos alimentares de origem animal e o aumento progressivo da resistência de algumas bactérias face aos antibióticos nas infeções humanas. O combate à ameaça de resistência antimicrobiana, em particular a resistência a antibióticos, é uma das prioridades da EMA e da rede reguladora de medicamentos europeia. Na medicina veterinária, a EMA tem promovido o uso prudente de AB em animais, recolhendo dados sobre o uso de antimicrobianos veterinários na União Europeia e fornecendo recomendações científicas sobre o uso de antimicrobianos específicos em animais (EMA, 2019). O uso de agentes antimicrobianos em animais pode contribuir para o aparecimento de bactérias resistentes que podem ser transferidas para os seres humanos, através da cadeia alimentar ou por contato direto. Tal situação pode reduzir a eficácia dos antimicrobianos no tratamento de doenças humanas. O aumento constante e a emergente ocorrência de bactérias resistentes a vários AB tornaram-se uma ameaça global e uma questão de Saúde Pública devido à falta de opções terapêuticas para o tratamento de certas infeções em humanos.

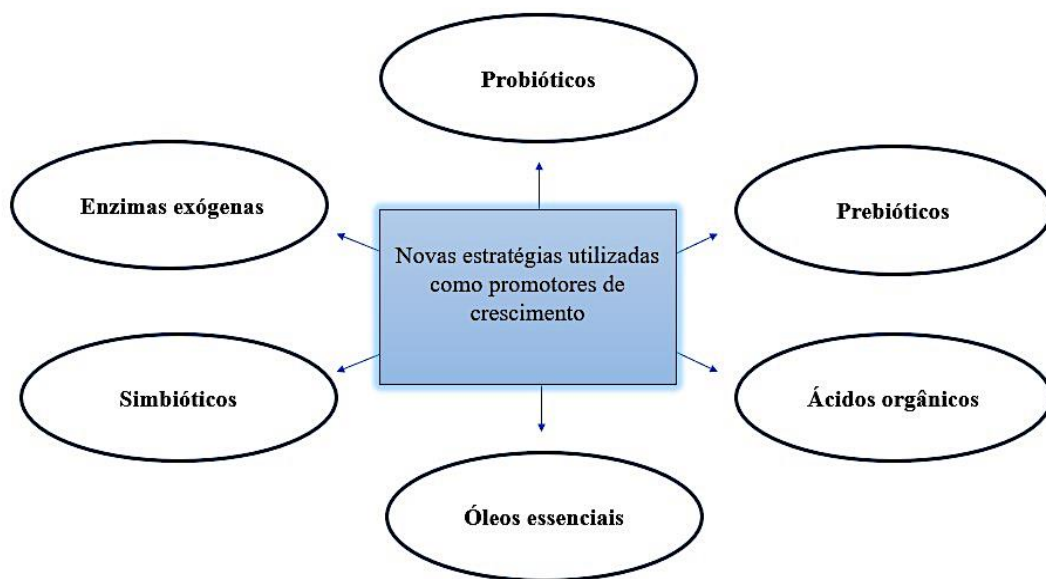
Em 1960, elevaram-se os primeiros protestos e críticas contra o uso de AB, como promotores de crescimento, na produção animal (Zurita and Mora, 2003). Em 1965, alguns relatórios evidenciaram o aumento de resistências aos AB nas bactérias, especialmente *Salmonella*. Em 1968, no Reino Unido, criou-se uma comissão para a regulamentação do uso de promotores de crescimento, indicando que era necessário

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

classificar os AB em duas categorias: terapêuticos e promotores; restringindo o uso com fins zootécnicos àqueles que não sofriam absorção e que não eram utilizados na terapia humana. Em 1977, o Mercado Comum Europeu publicou uma lista dos AB cuja utilização na alimentação animal foi autorizada em concentrações que variam de acordo com a espécie animal e o objetivo de utilização. Em 1986, na Suécia, os AB deixaram de ser utilizados como aditivos alimentares. Posteriormente, outros países adotaram a mesma proibição, nomeadamente Dinamarca e Reino Unido (Zurita and Mora, 2003).

Em 2006, a União Europeia proibiu o uso de AB como promotores de crescimento, dada a forte resistência bacteriana. Contudo, nos países em desenvolvimento, atualmente, ainda é frequente o uso de AB com esta finalidade devido, principalmente, ao elevado consumo de produtos animais nestes países (Khan *et al.*, 2012; Shamlo *et al.*, 2014).

Devido à pressão crescente para diminuir a utilização dos AB na produção animal, por questões relacionadas com a segurança alimentar e a resistência, têm-se investigado



**Figura 1:** Exemplos de produtos alternativos utilizados como promotores de crescimento na produção animal.

produtos alternativos, de diversas origens, com o intuito de estimular as próprias defesas do animal, melhorar a sua saúde, aumentar os rendimentos produtivos e melhorar os parâmetros reprodutivos. Estes aspetos permitem um aumento do ritmo de crescimento e

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

uma melhoria no índice de conversão, especialmente quando os fatores ambientais ou de exploração não são tão favoráveis. Alguns estudos da literatura reportam que é possível aumentar o ritmo de crescimento, prevenir patologias e melhorar a digestibilidade da dieta com a administração de probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, enzimas exógenas e óleos essenciais (Figura 1).

Tendo como base o enquadramento anterior, neste estudo formularam-se as seguintes questões:

- Serão os grupos de compostos explorados ao longo desta dissertação, utilizados como promotores do crescimento, alternativas consideradas promissoras face aos compostos cuja legislação proíbe ou restringe a sua utilização?
- Quais são os principais mecanismos de ação destes promotores do crescimento?
- Quais as vantagens nos possíveis sinergismos?

O objetivo do presente trabalho é, através de uma revisão bibliográfica de artigos pertinentes, efetuar uma análise evolutiva do tema, bem como reunir e retratar o estado da arte das novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal. Pretende-se também descrever e explicar os mecanismos de ação, com recurso à evidência científica mais atual que comprove o potencial destes compostos como alternativa aos promotores de crescimento proibidos. Adicionalmente, as vantagens de possíveis sinergismos entre os grupos de compostos explorados como promotores de crescimento são reportadas e analisadas.

A pesquisa de informação decorreu entre os meses de outubro de 2018 e outubro de 2019, utilizando bases de dados como o PubMed, o Science Direct e o Google Académico. Para a revisão consideraram-se os estudos mais relevantes no tema. Nas pesquisas de informação foram utilizadas as seguintes palavras-chave, em português e no equivalente em inglês: promotores de crescimento; ácidos orgânicos; probióticos; prebióticos; simbióticos, enzimas exógenas e óleos essenciais.

Este estudo justifica-se, por um lado, pelo interesse pessoal pelo tema e, por outro, por uma necessidade académica de aprofundar os conhecimentos nesta área. Quanto à motivação pessoal, pretendeu-se perceber se há suficientes evidências científicas que comprovem o potencial das novas alternativas aos AB como promotores de crescimento, para que estes não sejam usados em abuso e, com isso, contribuir para a crescente

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

resistência bacteriana. Hoje em dia há pessoas a falecer com infeções por bactérias multirresistentes causadas pelo uso excessivo de AB no passado. Quanto à motivação académica, a seleção deste tema resulta do facto de ser uma problemática bastante atual em termos de Saúde Pública.

Nas secções seguintes são apresentados vários estudos, que comprovam a eficácia da utilização destas alternativas como promotores de crescimento em várias espécies animais com interesse pecuário.

## **II. Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento**

Os promotores de crescimento são substâncias distintas dos nutrientes da ração alimentar, que aumentam o ritmo de crescimento e/ou melhoram o índice de conversão dos animais saudáveis. O índice de conversão relaciona o aporte nutricional com a quantidade de massa proteica que o animal produz (Zurita and Mora, 2003).

Nesta secção apresentam-se as estratégias mais recentes utilizadas como promotores de crescimento na produção animal, nomeadamente os ácidos orgânicos, os probióticos, os prebióticos, os simbióticos, as enzimas exógenas e os óleos essenciais. Em cada um dos grupos, apresentam-se os diversos mecanismos de ação e os respetivos estudos que comprovam a veracidade dos mesmos. Adicionalmente, apresentam-se alguns estudos que focam o sinergismo entre a utilização de vários promotores de crescimento.

### **II.1. Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos diferenciam-se dos ácidos inorgânicos por possuírem na sua estrutura geral um grupo carboxilo (COOH). Os ácidos orgânicos têm sido considerados potenciais alternativas ao uso de AB como promotores de crescimento na produção animal, atuando através de vários mecanismos. Nem todos os ácidos orgânicos apresentam efeitos na microflora intestinal. De facto, os ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana específica e com interesse como promotores de crescimento são ácidos de cadeia curta, podendo ser quimicamente divididos em ácidos monocarboxílicos simples (ácidos fórmico, acético, propiónico e butírico) e ácidos carboxílicos possuindo um grupo hidroxilo no carbono alfa (ácidos málico, láctico, cítrico e tartárico), tal como apresentado na Tabela 1 (Bagal *et al.*, 2016; Suiyanrayna and Ramana, 2015; Cherrington *et al.*, 1991; Dibner and Buttin, 2002).

**Tabela 1:** Fórmula química e características físico-químicas dos ácidos orgânicos utilizados como acidificantes em rações para suínos ou aves. Adaptado de Dibner and Buttin (2002).

| Ácido      | Fórmula  | MM<br>(Massa<br>Molar)<br>(g/mol) | Densidade<br>(g/ml) | Forma   | pKa<br>(Constante de<br>acidez) | Solubilidade<br>em água |
|------------|--|-----------------------------------|---------------------|---------|---------------------------------|-------------------------|
| Fórmico    | HCOOH  | 46.03                             | 1.220               | Líquido | 3.75                            | Solúvel                 |
| Acético    | CH <sub>3</sub> COOH                                 | 60.05                             | 1.049               | Líquido | 4.76                            | Solúvel                 |
| Propiónico | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH                 | 74.08                             | 0.993               | Líquido | 4.88                            | Solúvel                 |
| Butírico   | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH | 88.12                             | 0.958               | Líquido | 4.82                            | Solúvel                 |
| Lático     | CH <sub>3</sub> CH(OH)COOH                           | 90.08                             | 1.206               | Líquido | 3.83                            | Muito solúvel           |
| Sórbico    | CH <sub>3</sub> CH : CHCH : CHCOOH                   | 112.07                            | 1.204               | Líquido | 4.76                            | Moderadamente solúvel   |
| Fumárico   | COOHCH : CHCOOH                                      | 116.07                            | 1.635               | Líquido | 3.06                            | Moderadamente solúvel   |
| Málico     | COOHCH <sub>2</sub> CH(OH)COOH                       | 134.09                            |                     | Líquido | 3.4                             | Muito solúvel           |
| Tartárico  | COOHCH(OH)CH(OH)COOH                                 | 150.09                            | 1.76                | Líquido | 2.93                            | Muito solúvel           |
| Cítrico    | COOHCH <sub>2</sub> C(OH)(COOH)CH <sub>2</sub> COOH  | 192.14                            | 1.665               | Sólido  | 3.13                            | Muito solúvel           |

O recurso aos ácidos orgânicos como promotores de crescimento tem aumentado ao nível mundial, embora não exista um consenso relativamente às conclusões reportadas nos vários estudos realizados sobre a sua utilização. Estes compostos ácidos podem ser encontrados no reino vegetal e animal e podem resultar da fermentação bacteriana dos hidratos de carbono (Ruffino, 2013).

Os ácidos orgânicos podem ser administrados aos animais através de rações ou incluídos na água de bebida. Os sais de alguns destes ácidos têm também demonstrado possuir propriedades benéficas enquanto promotores de crescimento e, geralmente, são os constituintes de eleição para a formulação devido às suas propriedades inodoras, pouco voláteis e à facilidade de manuseamento no momento da produção da ração, visto que têm uma forma sólida, que dissolve bem em meio aquoso (Huyghebaert *et al.*, 2011). A mistura dos ácidos orgânicos e dos seus sais têm demonstrado apresentar um efeito sinérgico no controlo do desenvolvimento bacteriano.

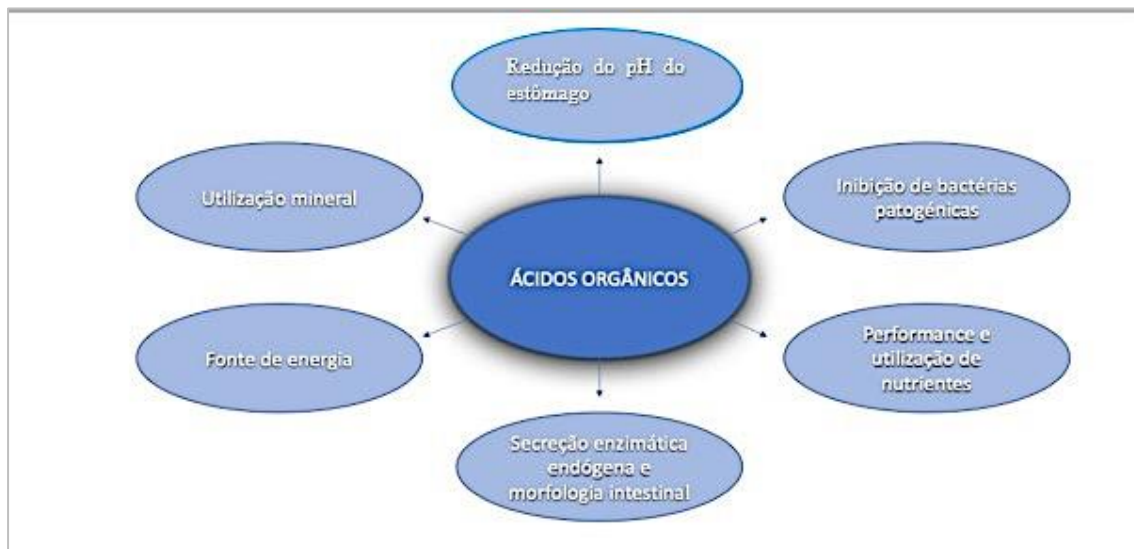
Os ácidos orgânicos apresentam interesse nesta área, uma vez que são económicos e exercem o seu efeito de promotor de crescimento num período de tempo curto, o que os torna benéficos para a produção animal. Além disso, a utilização deste tipo de ácidos é autorizada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para produção de carne e

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

apresentam a vantagem de não possuírem um limite de ingestão diária definido para seres humanos (Mani-López *et al.*, 2012).

A adição de alguns ácidos orgânicos, ou misturas destes, nos alimentos dos animais ajuda na digestão de proteínas mal digeridas, aumentando a absorção destas. No caso em que as proteínas são mal digeridas, estas sofrem o processo de fermentação por parte das bactérias, produzindo produtos, como amônia, ácidos gordos voláteis, ácidos gordos de cadeia ramificada, lactato, gases (dióxido de carbono, metano e hidrogénio). Alguns destes compostos podem ter efeitos negativos para o crescimento animal

Como promotores de crescimento, os ácidos orgânicos podem atuar por diferentes mecanismos de ação (Figura 2).



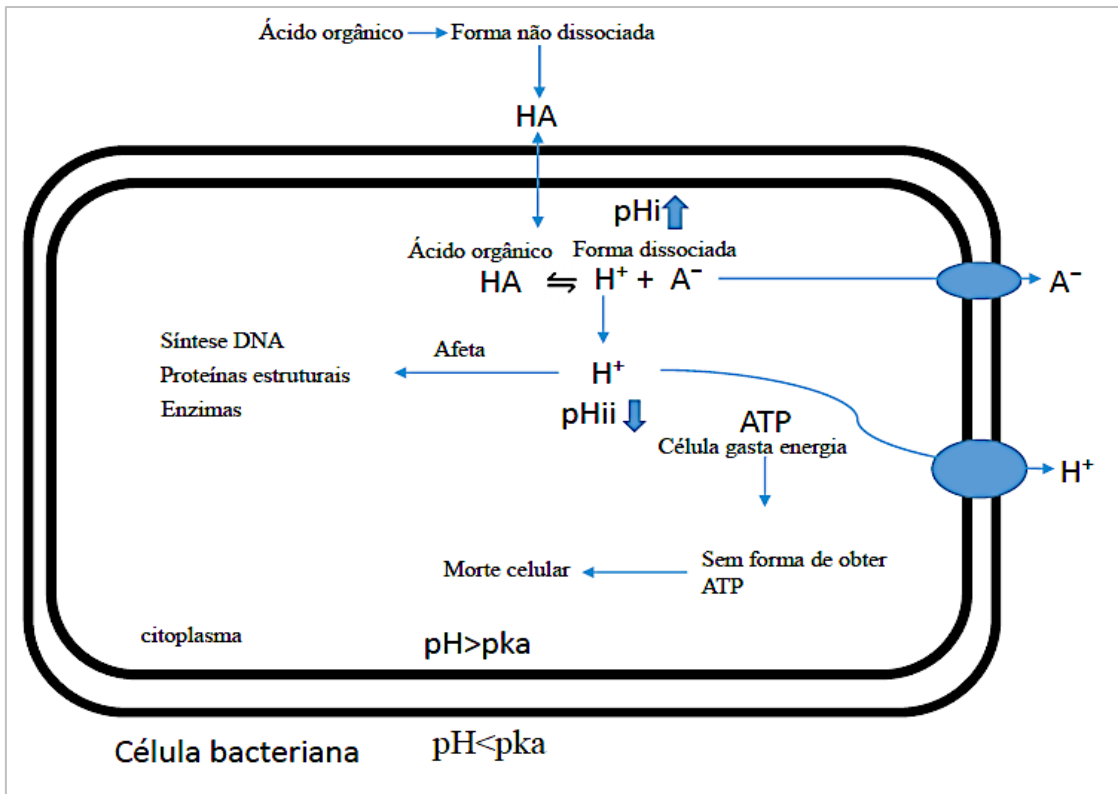
**Figura 2:** Diferentes mecanismos de ação dos ácidos orgânicos como promotores de crescimento na produção animal.

### II.1.1. Inibição de bactérias patogênicas

Um dos mecanismos de ação dos ácidos orgânicos relaciona-se com a capacidade destes compostos alterarem as populações microbianas, de acordo com o seu espectro antimicrobiano de atividade. Cada ácido orgânico possui propriedades diferentes em relação a cada uma das bactérias envolvidas, as quais dependem de vários fatores, nomeadamente (Dibner and Buttin, 2002): do pH, da concentração, do valor de  $pK_a$ , da capacidade tampão da ração, do tempo de retenção/exposição.

A importância do pH baixo para a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos pode ser explicada pelo efeito deste parâmetro na dissociação do ácido. A absorção dos ácidos orgânicos depende dos valores de  $pK_a$  de cada um dos ácidos. Na presença de um pH baixo, o ácido orgânico encontra-se essencialmente na forma não dissociada. Os ácidos orgânicos lipófilos na forma não dissociada conseguem difundir através das membranas celulares. O pH no interior das bactérias é normalmente 7, i.e. superior ao valor de  $pK_a$  dos ácidos orgânicos que apresentam atividade microbiana (Previdello *et al.*, 2006). Nestas condições, ocorre a dissociação do ácido, o que provoca uma descida de pH no interior das células, criando um ambiente de stress oxidativo para as bactérias. Adicionalmente, a diminuição do pH nas células bacterianas interrompe as reações enzimáticas, como por exemplo, a catalase e a descarboxilase, e perturba os sistemas de transporte de nutrientes (Huyghebaert *et al.*, 2011).

Os efeitos dos ácidos orgânicos ao nível bacteriano originam disfunções celulares, ocorrendo um gasto de energia por parte da bomba ATPase necessário para o processo de transporte do próton ( $H^+$ ) livre para fora da célula. Desta forma, verifica-se uma redução da disponibilidade de energia para a proliferação celular, resultando na posterior morte da bactéria. Adicionalmente, como consequência do processo de dissociação dos ácidos orgânicos, ocorre uma acumulação dos aniões, tornando-se tóxicos e inibindo vários processos fisiológicos importantes para o desenvolvimento da bactéria, tais como: inibição da glicólise, inibição da síntese de ácidos nucleicos (Figura 3) (Mani-López *et al.*, 2012; Huyghebaert *et al.*, 2011; Sugiharto, 2016).



**Figura 3:** Mecanismo de inibição das bactérias patogênicas pela ação dos ácidos orgânicos. Adaptado de Mani-López *et al.*, 2012) e Adil *et al.*, 2010.

Deste modo, as espécies tolerantes ao ácido, como as *Lactobacillus* spp., benéficas para a saúde intestinal, deixam de competir pelos nutrientes e proliferam, contribuindo para uma flora intestinal mais homogênea (Goodarzi Boroojeni *et al.*, 2014; Nava *et al.*, 2009; Czerwiński *et al.*, 2010).

Knarreborg *et al.* (2004) concluíram que, ao inibir o desenvolvimento das bactérias patogênicas com a utilização dos ácidos orgânicos, diminui-se a quantidade dos metabolitos tóxicos produzidos por estas bactérias e que afetam o crescimento do animal, nomeadamente, a produção de amônia, produtos da degradação da bÍlis e fenóis aromáticos. Como consequência, ocorre uma redução da inflamação da parede intestinal do animal, bem como uma diminuição do grau de descamação e renovação das vilosidades, tornando a parede mais lisa e fina.

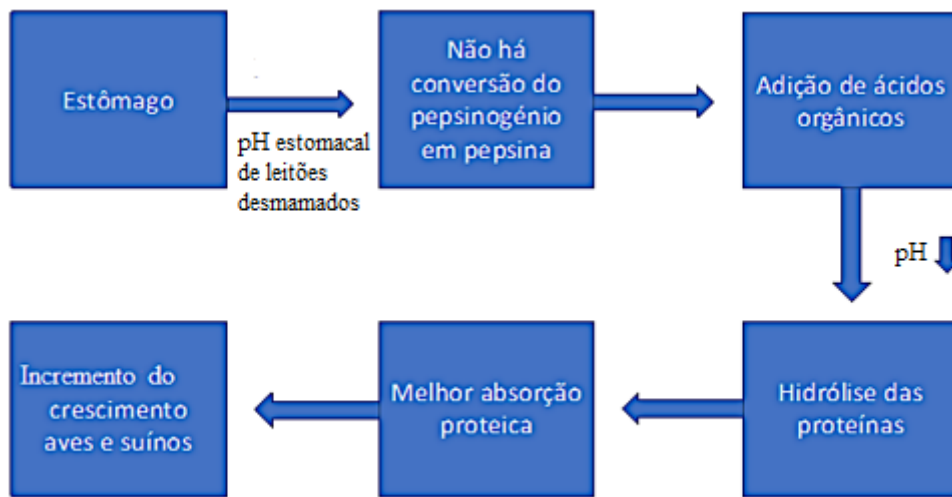
Øverland e colaboradores (2007) efetuaram um estudo, envolvendo 60 porcos, as suas dietas variavam entre: (i) dieta basal, (ii) dieta basal adicionada de 1,0% de ácido fórmico, (iii) dieta basal adicionada de 0,85% de ácido benzóico, (iv) basal dieta adicionada de 0,85% de ácido sórbico, (v) dieta basal adicionada de 1,2% de gordura revestida Ca-butirato (Ca-butirato revestido normal) e (vi) dieta basal adicionada de 1,5%

de gordura e Ca-butirato (complexo cálcio-butirato) revestido de inulina (25% de inulina; Ca-butirato revestido de inulina). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da suplementação das dietas com ácidos orgânicos no desempenho do crescimento, na composição da microbiota no trato gastrointestinal (TGI), na concentração de escatol e indol do conteúdo digestivo, do plasma e do tecido adiposo e na concentração de ácidos gordos voláteis na conteúdo digestivo. O escatol é uma amina, que juntamente com o indol, são produtos da degradação do triptofano, estes têm sido estudados pela sua possível toxicidade para o hospedeiro. Podem ser eliminados através das fezes, ou serem absorvidos pelo intestino, ser metabolizado no fígado e eliminados através da urina, ou então, também podem ser acumulados na gordura do animal, gerando o odor característico de macho inteiro. Os resultados demonstraram que a adição de ácidos orgânicos às dietas não teve efeito no aumento do peso diário dos animais ou na quantidade de alimento ingerido, mas os ácidos fórmico, benzóico e sórbico tenderam a melhorar o índice de conversão alimentar dos porcos quando comparados com os porcos pertencentes ao grupo controle. A suplementação com ácidos orgânicos não afetou os níveis de escatol, indol ou ácidos gordos voláteis na digestão ou os níveis de escatol ou indol no tecido adiposo comparado com o controle. Os níveis de escatol plasmático foram reduzidos em porcos alimentados com dietas contendo ácido fórmico e benzóico quando comparados com os porcos do grupo controle. Os porcos alimentados com ácidos orgânicos apresentaram níveis mais baixos de bactérias produtoras de coliformes, *Enterococcus* e bactérias produtoras de ácido láctico no TGI. A suplementação de dietas com ácidos orgânicos não afetou os níveis de escatol na digestão (Øverland *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos depende do pH do meio. Estes compostos são eficazes em espécies que sejam sensíveis aos ácidos, reduzindo a competição entre bactérias pelos nutrientes e perdas de azoto endógeno. A secreção de mediadores imunológicos e a diminuição de infecções gastrointestinais (GI) contribuem também para reduzir a produção de metabolitos microbianos tóxicos e de amônia que impedem o crescimento do animal (Suiryanrayna and Ramana, 2015).

### II.1.2. Descida do pH gástrico

Outro mecanismo de ação incide na capacidade que os ácidos orgânicos apresentam em baixar o pH do estômago dos animais, inibindo o desenvolvimento das bactérias patogênicas. Alguns autores constataram que, em determinadas espécies de animais, como nas aves e nos suínos, a descida do pH no estômago ativa determinados sistemas enzimáticos responsáveis por melhorar a digestibilidade das proteínas, promovendo um aumento da absorção e, conseqüentemente, uma diminuição da excreção proteica. A Figura 4 apresenta uma representação esquemática deste mecanismo (Suiryanrayna and Ramana, 2015).



**Figura 4:** Processo de acidificação estomacal para posterior ativação da pepsina, aumento da absorção proteica e, conseqüente, aumento do crescimento das aves e suínos.

Segundo Suiryanrayna e Ramana (2015), os leitões durante o período de desmame estão sujeitos a condições que podem ser stressantes para o animal, reduzindo a ingestão de alimentos e, conseqüentemente, o ganho de peso é mínimo ou, por vezes, pode ser nulo. Durante este período, o suíno é fisiologicamente imaturo e a produção de ácido clorídrico encontra-se reduzida, podendo não ser suficiente para manter o pH do estômago no valor ideal, ou seja, aproximadamente 3,5. Desta forma, o processo de digestão pode ficar comprometido (Harada *et al.*, 1988; Suiryanrayna and Ramana, 2015). Adicionalmente, as dietas para leitões desmamados apresentam, geralmente, uma capacidade de tamponamento elevada, o que torna ainda mais difícil atingir a acidez estomacal pretendida, i.e. um intervalo de pH entre 2 e 3,5, na qual a digestão de proteínas

é máxima. Suiryanrayna e Ramana (2015) referem que, nos leitões desmamados, se o pH do estômago não estiver nos valores referidos anteriormente, o pepsinogénio (o precursor da pepsina) não é convertido em pepsina, i.e. a enzima proteolítica responsável pela digestão das proteínas. A atividade desta enzima diminui se os valores de pH estiverem compreendidos entre 5 e 6 e é nula para valores superiores. Nestas circunstâncias, verifica-se, conseqüentemente, uma diminuição da absorção proteica.

No período de desmame, a mudança do leite para a ração pode originar o aparecimento de perturbações ao nível do trato GI que se traduzem no aparecimento de diarreias. Desta forma, a lactose que está presente no leite não é fermentada a ácido láctico e, conseqüentemente, não contribui para a diminuição do pH no estômago. Na presença de um pH elevado, a digestão da ração está dificultada e ocorre a fermentação desta no intestino grosso, podendo originar situações de diarreia. Para combater tal problema, alguns investigadores testaram a adição de ácidos orgânicos na dieta, ocorrendo uma descida de pH gástrico (Suiryanrayna and Ramana, 2015; Canibe *et al.*, 2001).

Tsiloyiannis *et al.* (2001) avaliaram a eficácia dos ácidos orgânicos na dieta para o controlo da síndrome da diarreia pós-desmame dos leitões, patologia causada principalmente por estirpes enterotóxicas de *Escherichia coli* (Tsiloyiannis *et al.*, 2001). Os leitões foram divididos em oito grupos aos quais foram oferecidas, durante um período de 28 dias, diferentes dietas: (i) dieta base, sem qualquer adição de agente antimicrobiano (controlo negativo); (ii) dieta base suplementada com 44 p.p.m. de lincomicina e 44 p.p.m. de espectinomicina (pré-mistura Lincospectin® 22, Upjohn) (controlo positivo) e os restantes seis grupos foram alimentados com dietas suplementadas com 1% a 0% de ácido propiónico, 1% a 6% de ácido láctico, 1,2% de ácido fórmico, 1,2% ácido málico, 1,5% de ácido cítrico ou 1,5% de ácido fumárico. Os grupos foram comparados em relação ao aparecimento de sinais clínicos de diarreia, mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar. Todos os grupos suplementados com ácidos orgânicos apresentaram incidência e gravidade reduzidas de diarreia e desempenho significativamente melhor que os animais pertencentes ao grupo controlo negativo ( $P < 0,05$ ). Após os 28 dias, as estirpes enterotóxicas de *Escherichia coli* foram detetadas no grupo controlo negativo mas não no grupo controlo positivo, i.e. dieta suplementada com antibióticos. De acordo com os resultados deste estudo, os autores concluíram que os ácidos orgânicos, especialmente o ácido láctico, são uma ferramenta útil no controlo da síndrome da diarreia pós-desmame,

podendo ser utilizados de uma maneira eficaz como alternativa aos antibióticos (Tsiloyiannis *et al.*, 2001).

### **II.1.3. Fonte energética**

Os ácidos orgânicos podem ser utilizados como fonte de energia, de uma forma tão eficaz quanto a glicose, no intestino dos animais. Nestas situações, os processos de gliconeogénese e lipólise ficam comprometidos (Giesting and Easter, 1985).

Os ácidos gordos de cadeia curta, como os ácidos butírico, propiónico e acético, produzidos pela fermentação das bactérias, através da digestão das fibras alimentares no intestino, podem ajudar na manutenção da integridade da mucosa intestinal, uma vez que os estes ácidos gordos de cadeia curta são a fonte energética preferida das células epiteliais, particularmente o butirato. Desta forma, verifica-se um aumento da área de absorção intestinal, permitindo um aumento na absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, um aumento do crescimento do animal. Por vezes, os ácidos gordos voláteis de cadeia curta produzidos pelas bactérias, através da fermentação das fibras alimentares, não são suficientes, tornando-se benéfico a adição de ácidos orgânicos exógenos às dietas dos animais, os quais aumentam a digestibilidade dos alimentos (Von Engelhardt *et al.*, 1989). Alguns dos ácidos orgânicos podem também estimular o crescimento das vilosidades intestinais, como o ácido butírico (Bedford and Gong, 2018). Concluindo, é possível afirmar que os ácidos orgânicos podem ser considerados um componente nutricional da dieta pois podem prover o aumento da absorção de nutrientes no TGI, levando ao incremento da energia disponível para o metabolismo animal.

Blank *et al.* (1999) estudaram o efeito de diferentes concentrações de ácido fumárico na suplementação da dieta, e tentaram verificar se a capacidade tampão da dieta influenciava a digestibilidade da proteína bruta, da energia bruta e dos aminoácidos ao nível do íleo e do conteúdo fecal. Neste estudo foram utilizados 12 leitões, com 14 dias de idade. Na experiência 1, a dieta foi composta por uma base de trigo e farelo de soja, com ácido fumárico na concentração de 1, 2 e 3%. Aos animais do grupo controlo foi-lhes administrado uma dieta sem nenhum ácido orgânico adicionado. Numa segunda experiência, a dieta foi igual à da experiência 1, mas suplementada com 3% de bicarbonato de sódio, de modo a aumentar, a capacidade tampão da dieta. A inclusão de

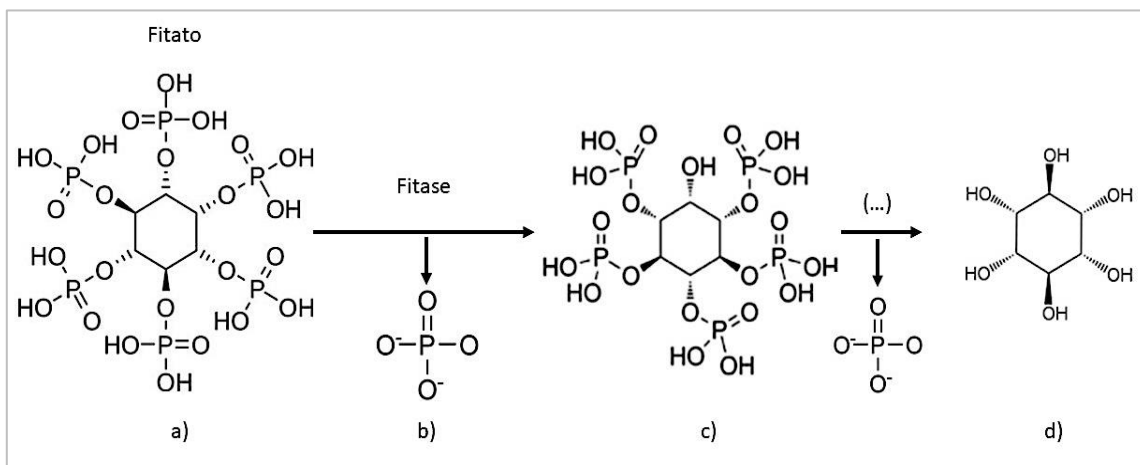
ácido fumárico nas dietas com capacidade tampão reduzida aumentou a digestibilidade no íleo da proteína bruta, da energia bruta e da maioria dos aminoácidos. Dentro das três concentrações de ácido usadas, a de 2% foi a que mais aumentou os parâmetros anteriores. Na experiência 2, onde se testou uma dieta com capacidade tampão elevada, observou-se, no íleo, uma diminuição da digestibilidade dos aminoácidos quando comparado com a dieta de capacidade tampão reduzida. Quanto à análise do conteúdo da digestão fecal não foram observadas alterações para nenhuma das dietas. Com este estudo foi possível estabelecer uma correlação positiva entre a suplementação com ácido fumárico e digestibilidade do íleo, na dieta com poder tampão reduzido. Na dieta com capacidade tampão elevada não foi possível estabelecer correlações. Os autores concluíram que, a suplementação da dieta com ácido fumárico aumenta a digestibilidade no íleo. Os autores também reportaram que outro mecanismo de ação possível é os suínos utilizarem o ácido fumárico como fonte de energia prontamente disponível para o crescimento de células epiteliais. Estes efeitos traduzem-se num aumento da superfície de absorção dos nutrientes da dieta e numa rápida recuperação da mucosa epitelial do trato GI. O ácido fumárico tem a capacidade de estimular o desenvolvimento da mucosa intestinal, uma vez que serve de substrato energético.

#### **II.1.4. Utilização de minerais**

A ração dos suínos, por exemplo, é composta em grande parte por ingredientes de origem vegetal. Nestas dietas, o fósforo encontra-se complexado, em cerca de dois terços da sua composição, na forma de fitato. A enzima responsável pela degradação do fitato é a fitase. Esta enzima é produzida pelas bactérias comensais da flora intestinal, podendo estar presente em alguns ingredientes das dietas e nas secreções digestivas. No caso dos suínos, a atividade da fitase no TGI é mínima, pois a sua produção endógena é reduzida e nem sempre está ativada devido aos valores de pH do meio. Atendendo a estes aspetos, a utilização de ácidos orgânicos proporciona uma descida do pH intestinal e permite ativar a ação das enzimas, nomeadamente da fitase. Com a ativação da fitase, ocorre a degradação do fitato, com consequente libertação do fósforo inorgânico, o qual fica disponível para ser absorvido. Este mineral apresenta vantagem para a performance do animal, uma vez que o fósforo é essencial quer no desenvolvimento ósseo e dentário, quer

no metabolismo orgânico, estando integrado na constituição dos fosfolípidos e das fosfoproteínas do sistema nervoso (Nunes, 1998; McDonald *et al.*, 2010).

Como já referido, a produção endógena da enzima fitase é reduzida em alguns animais, como os suínos; desta forma, o fitato não vai ser hidrolisado, resultando na libertação de fósforo para o ambiente. Neste contexto, o fósforo presente nos alimentos ingeridos pelo animal pode ser considerado não só uma causa de poluição, como também constituir um desperdício mineral para o animal (Suiryanrayna and Ramana, 2015; Bertechini, 2012). Outra estratégia usada para aumentar a biodisponibilidade do fósforo é a adição da enzima fitase diretamente à dieta, a qual ajuda a hidrolisar o fitato (mio-inositol hexacisfosfato) em mio-inositol-2-monofosfato e fósforo inorgânico, tal como representado na Figura 5.



**Figura 5:** Libertação do fósforo inorgânico do fitato através da ação da enzima fitase: a) Mio-inositol hexacisfosfato; b) Fósforo disponível para o animal; c) Mio-inositol pentacisfosfato; d) Mio-inositol-2-monofosfato. Adaptado de Petersen (2001).

Adicionalmente, os ácidos orgânicos podem aumentar a absorção de outros minerais, tais como, o cobre, o zinco, o ferro, o magnésio e o cálcio (Suiryanrayna and Ramana, 2015). O fitato tem um certo poder de quelatação. Quando forma complexos com os minerais, o composto resultante é insolúvel, resultando numa diminuição da biodisponibilidade dos minerais. Na presença dos ácidos orgânicos, o pH do TGI desce tornando favorável a ação da fitase, os aniões destes ácidos formam complexos com o fitato, permanecendo desta forma os minerais livres e disponíveis para serem absorvidos (Selle *et al.*, 2007; Forbes *et al.*, 1984). Um outro aspeto a considerar é a formação de complexos entre aniões dos ácidos orgânicos e alguns minerais, como o cálcio, magnésio, fósforo e zinco, aumentando a sua digestão e absorção e diminuindo a excreção, através das fezes. Estes

efeitos contribuem para o aumento da biodisponibilidade destes minerais (Liem *et al.*, 2008).

### **II.1.5. Propriedades conservantes**

Alguns ácidos orgânicos são, frequentemente, usados como conservantes para evitar que as matérias-primas e as rações sofram deterioração devido à ação de fungos, leveduras e bactérias (Skřivanová *et al.*, 2006; Penz Jr *et al.*, 1993).

A inclusão de ácidos orgânicos nos alimentos dos animais reduz o pH da ração e, desta forma, impede o crescimento de microrganismos indesejáveis durante o armazenamento, podendo mesmo inibir a libertação de metabolitos tóxicos (especialmente micotoxinas) produzidos por fungos (Karlovsky *et al.*, 2016). A ingestão de alimentos contaminados com micotoxina, mesmo em pequenas quantidades, pode causar sérios problemas nutricionais e de saúde durante a produção animal, traduzindo-se em perdas económicas significativas. Atendendo a estas considerações, a acidificação da ração aumenta a qualidade da mesma em termos higiénicos, reduzindo a perda de valor nutricional durante o armazenamento. Por outro lado, os ácidos orgânicos diminuem a capacidade tampão de alguns ingredientes das rações, garantindo o pH intestinal ideal, o que resulta numa melhor digestão, ou seja, numa melhor absorção dos nutrientes, particularmente em animais jovens (Metzler and Mosenthin, 2007).

## II.2. Probióticos

O conceito de probiótico sofreu várias alterações ao longo dos anos. Lilly e Stillwell, em 1965, utilizaram, pela primeira vez, a designação de “probiótico” para referir uma substância desconhecida produzida por um microrganismo que promoveu o crescimento de outro microrganismo (Lilly and Stillwell, 1965). Os mesmos autores definiram também probióticos como sendo o antônimo de antibiótico.

Mais tarde, Parker (1974) definiu probióticos como sendo organismos vivos e substâncias não vivas que contribuem para a proliferação e o equilíbrio. Em 1989, Fuller alterou a palavra “substâncias” e definiu probióticos como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano (Fuller, 1989).

De acordo com a definição apresentada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (Morelli and Capurso, 2012) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (Bajagai *et al.*, 2016).

De acordo com estas designações, os probióticos são culturas de microrganismos vivos que se alojam no TGI, favorecendo o desenvolvimento de determinadas bactérias saprófitas necessárias para o organismo e, simultaneamente, impedem a proliferação de microrganismos patogênicos. Os efeitos benéficos dos probióticos para os animais hospedeiros podem traduzir-se num aumento do ritmo de crescimento ou da resistência a doenças. Os microrganismos que constituem os probióticos devem manter-se viáveis, quer durante os períodos de fabrico, armazenamento, quer após a sua administração. Esta cultura de microrganismos deve sobreviver, colonizando o TGI, e metabolizar em ambiente gastrointestinal, suportando o pH baixo e, adicionalmente, devem produzir substâncias antibacterianas para impedir a proliferação de bactérias patogênicas (Ezema, 2013).

A Figura 6 apresenta uma representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos.

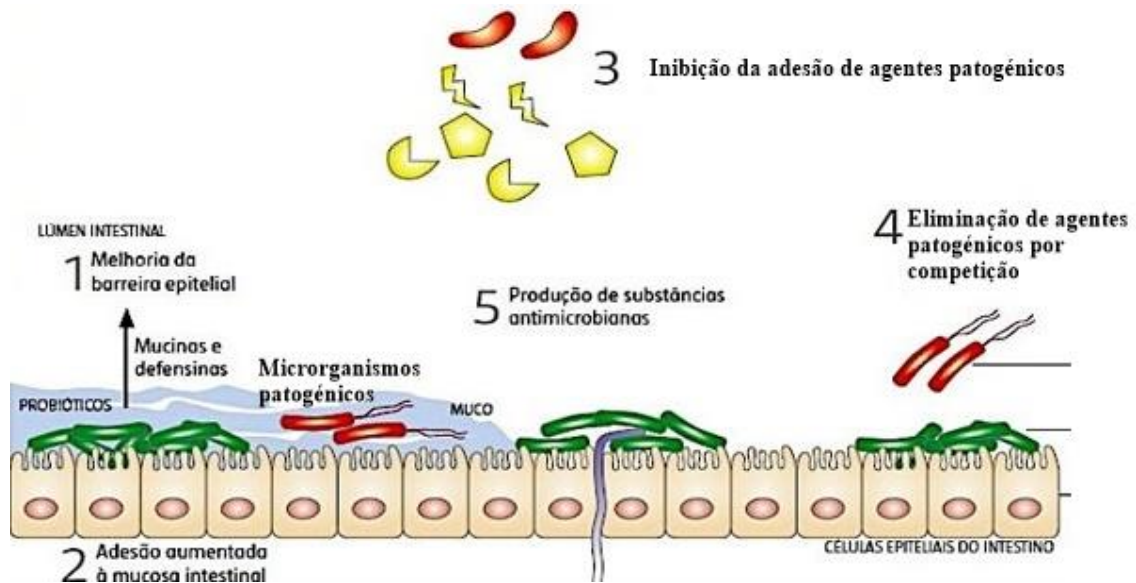


Figura 6: Mecanismos de ação dos probióticos. Adaptado de Bermudez-Brito *et al.*, 2012.

### II.2.1. Competição dos probióticos por locais de ligação

Existem alguns microrganismos não colonizadores, como por exemplo o gênero *Bacillus spp.* e a *Saccharomyces cerevisiae*, que apenas acompanham o conteúdo intestinal e não aderem ao epitélio intestinal. Tal não acontece com as bactérias colonizadoras do TGI, nomeadamente *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* que utilizam fímbrias para a adesão ao epitélio (Huyghebaert, 2003).

Os probióticos têm a capacidade de colonizar as paredes do intestino, aderindo às células epiteliais, formando uma barreira física e impedindo que as bactérias patogênicas compitam pelos recetores celulares (Busanello, 2012; Roth, 2000).

Os probióticos conseguem obter e metabolizar os nutrientes luminiais mais rapidamente do que as bactérias patogênicas que não estão aderidas, competindo assim pelos nutrientes (Busanello, 2012).

Nas aves, as populações microbianas intestinais assumem um estado quase estável ao fim de uma semana de existência, o que deixa uma janela muito pequena para a remodelação permanente da microbiota intestinal. Desta forma, e de um modo semelhante

ao que acontece com os humanos, são os primeiros colonizadores que determinam o destino da população microbiana, e depois que a microbiota se desenvolve, há poucas hipóteses de ocorrer uma modificação permanente, uma vez que a população estável resiste à mudança. Baldwin *et al.*, (2018) realizaram um estudo, envolvendo pintos recém-nascidos. Os animais foram divididos em dois grupos: (i) animais aos quais não foi inoculado probióticos (grupo controle) e (ii) animais aos quais foram administrados um liofilizado de *Lactocillus spp.* com *L. reuteri*, *L. agilis* e *L. ingluviei* durante 28 dias. No final deste período, as aves inoculadas com a mistura probiótica apresentaram pesos significativamente maiores em relação aos animais do grupo controle. Os autores ainda verificaram que, embora cada estirpe tenha sido capaz de colonizar o intestino quando administrada isoladamente, a administração da mistura probiótica resultou apenas na colonização do intestino pela estirpe *L. ingluviei*. Adicionalmente, verificou-se que a elevada abundância inicial de *L. ingluviei* reduziu lentamente; contudo, os efeitos da administração inicial da mistura de *Lactobacillus* na modificação do desenvolvimento e estrutura da microbiota persistiram. De acordo com os resultados deste estudo, verificou-se que a adição dos probióticos promoveu uma proliferação da microbiota intestinal homogênea, ocupando os espaços que poderiam vir a ser ocupados pelas bactérias patogênicas por um mecanismo de competição, diminuindo a tendência para infecções e facilitando a absorção dos nutrientes. Os autores concluíram que as bactérias podem atuar como adjuvantes orais e produzir uma maior resistência às infecções entéricas (Baldwin *et al.*, 2018).

### **II.2.2. Produção de substâncias antimicrobianas**

Os probióticos têm a capacidade de produzir substâncias bactericidas, denominadas de bacteriocinas. Estas substâncias incluem os ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico), que são produtos finais resultantes da fermentação bacteriana, cujo o mecanismo de ação foi explorado anteriormente. Os ácidos acima descritos têm elevado efeito inibitório contra bactérias Gram-negativas. A forma não dissociada do ácido orgânico permeia a membrana da célula bacteriana e dissocia-se no citoplasma das bactérias, como já foi acima descrito no capítulo dos ácidos orgânicos.

Adicionalmente, as bactérias Gram-positivas como, bactérias ácido-láticas, apresentam a capacidade de produzir péptidos antimicrobianos, como por exemplo lactacina B de *L. acidophilus*, plantaricina de *L. plantarum* e nisina de *Lactococcus lactis*, os quais se ligam às células epiteliais formando poros na membrana e também inibem a síntese da parede celular, destruindo as células alvo. A nisina forma um complexo com o último precursor da parede celular, lípido II, inibindo a biossíntese da parede celular. Posteriormente, este complexo agrega-se e incorpora péptidos que vão formar poros na membrana bacteriana (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Bierbaum and Sahl, 2009).

### II.2.3. Estimulação do sistema imunitário

A microflora intestinal pode afetar as funções imunológicas do TGI, existindo evidências de que bactérias intestinais normais e, inclusivamente, microrganismos administrados diretamente por via oral, estimulam o sistema imunológico em animais sãos (Zurita and Mora, 2003).

Alguns probióticos de microrganismos atuam como antigénios ao nível das células epiteliais do intestino e das placas de Peyer, desencadeando um aumento da produção de imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina (IgA), assim como, a migração das células T ao nível intestinal. Os probióticos conseguem também favorecer a atividade fagocitária dos macrófagos alveolares o que sugere uma ação a nível sistémico (Perdigón and Holgado, 2000; Ross, 2002).

Num estudo, envolvendo 696 frangos, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de tratamento (Bai *et al.*, 2013). Os tratamentos variaram de alimentação, tendo sido administrado ração sem aditivos, ração com 100 mg de antibiótico, ração com 0,1% de probióticos ou ração com 0,2% de probióticos. Os resultados demonstraram que a utilização de probióticos, nomeadamente *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae*, numa concentração de 0,1%, durante o 1º e o 21º dia, aumentou o peso dos frangos, em relação aos frangos alimentados sem aditivos e com 100 mg de antibiótico. Os autores verificaram também que a adição de probióticos nas rações aumentou o número de linfócitos T, ao contrário do verificado nos grupos dos frangos suplementados com antibiótico. Desta forma, a suplementação de probióticos a 0,1% estimula o sistema imunitário e aumenta o crescimento dos frangos.

#### **II.2.4. Aumento do efeito nutricional**

Os probióticos têm a capacidade de digerir os hidratos de carbono, ajudando na digestão dos alimentos, promovendo uma maior disponibilidade dos mesmos, uma maior absorção a nível intestinal e, conseqüentemente, contribui para acelerar o crescimento e o desenvolvimento celular. Adicionalmente, os probióticos evitam que as bactérias patogénicas se alimentem dos aminoácidos, minerais e hidratos de carbono, impedindo a produção de compostos com ação tóxica. Desta forma, estes produtos contribuem para uma melhor eficiência alimentar e desempenho do animal hospedeiro (Guillot, 2000).

As bactérias produtoras de ácido láctico, como por exemplo *Lactobacillus spp.*, reduzem o pH intestinal, aumentando o transporte de ácidos gordos voláteis através do epitélio intestinal. Uma vez que os ácidos em meios com um pH ácido, encontram-se na sua forma não dissociada, o que significa que permeiam mais facilmente que a forma dissociada (Cherrington *et al.*, 1991). Sendo estes ácidos gordos absorvidos vão poder ser transformados em energia, melhorando a absorção de nutrientes (Roth, 2000).

#### **II.2.5. Reforço da barreira epitelial**

O epitélio intestinal está em contacto permanente com o conteúdo luminal e com a flora microbiana. A barreira intestinal é um importante mecanismo de defesa usado para manter a integridade epitelial e proteger o organismo do meio ambiente (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). As defesas da barreira intestinal consistem na camada mucosa, peptídeos antimicrobianos, IgA secretora e o complexo de adesão da junção epitelial (Ohland and MacNaughton, 2010). Quando esta barreira deixa de realizar a sua função, os antígenos bacterianos e alimentares podem atingir a submucosa, induzindo respostas inflamatórias, o que pode resultar em distúrbios intestinais. A administração de probióticos pode contribuir para manter a integridade da função da barreira intestinal. No entanto, os mecanismos pelos quais os probióticos aumentam esta função de barreira não são totalmente compreendidos (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

A adesão à mucosa intestinal é considerada um pré-requisito para a colonização e é importante para a interação entre espécies probióticas e o hospedeiro (Beachey, 1981).

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

As células epiteliais excretam mucina, que é uma mistura de glicoproteínas, como por exemplo imunoglobulinas, proteínas livres, lípidos e sais, dificultando a adesão das bactérias patogénicas às paredes do intestino. Alguns probióticos têm a capacidade de produzir proteínas que, posteriormente, irão contactar com os enterócitos e colonizar o intestino, contribuindo para um aumento da função da barreira epitelial, pois as bactérias patogénicas não conseguem aderir à parede (Bajagai *et al.*, 2016).

A proteína de adesão à mucosa faz a ligação dos probióticos ao muco. A presença de bactérias patogénicas, como por exemplo *E. coli* enteropatogénica, estimula as mucinas a produzirem muco, evitando a adesão das bactérias patogénicas ao intestino. A produção de muco é induzida na presença de probióticos, favorecendo a eliminação das bactérias patogénicas do muco por um mecanismo competição (Sicard *et al.*, 2017).

### II.3. Prebióticos

O conceito de prebióticos sofreu uma evolução ao longo do tempo. Este termo foi introduzido pela primeira vez em 1995, em que se sugeriu que estes compostos seriam componentes alimentares não digeridos, que, através de estimulação do crescimento e/ou atividade de um único tipo ou de uma quantidade limitada de microrganismos residentes no TGI melhoram a condição de saúde do hospedeiro (Gibson and Roberfroid, 1995). Em 2004, reformulou-se a definição de prebiótico, referindo-se ao componente fermentado seletivamente, que permite alterações específicas na composição e/ou atividade de microrganismos no TGI, benéfico para a saúde e bem estar do hospedeiro (Gibson *et al.*, 2004). Em 2007, surgiu um novo conceito, ou seja, o prebiótico seria um componente alimentar não viável que confere um benefício à saúde do hospedeiro associado à modulação da microbiota, por exemplo, que favorecesse a alimentação da microbiota intestinal benéfica para o hospedeiro. Em 2010, Gibson *et al.* (2010) definiram prebióticos como sendo “ingredientes seletivamente fermentáveis, não digeríveis, dos quais resulta a alteração do crescimento e da atividade de algumas bactérias do microbiota intestinal, proporcionando benefícios para a saúde do hospedeiro”. Mais tarde, em 2015, referem-se a prebióticos como sendo, um composto não digerível que, através da sua metabolização por microrganismos no intestino, modula a composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo, assim, um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro (Bindels *et al.*, 2015; Corzo *et al.*, 2015). Por último, a mais recente atualização da definição feita pela *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), considera que prebiótico é um substrato que é utilizado seletivamente pelos microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde (Gibson *et al.*, 2017).

Os prebióticos para serem classificados como componentes alimentares devem apresentar cinco propriedades (Kolida *et al.*, 2002; Slavin, 2013; Wang, 2009): (i) têm de ser resistentes ao pH ácido estomacal; (ii) não podem ser hidrolisados nem absorvidos na parte superior do TGI; (iii) devem ser seletivamente fermentados por uma ou um número limitado de bactérias comensais; (iv) como resultado da sua fermentação devem ocorrer alterações dos processos metabólicos e melhoria do sistema imunológico, proporcionando um efeito benéfico na saúde do hospedeiro; (v) devem permitir o crescimento seletivo dos probióticos.

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

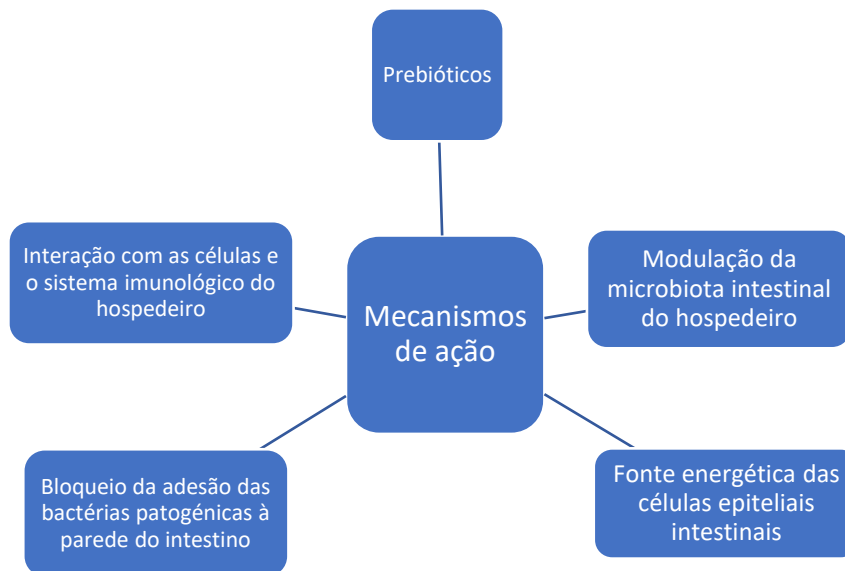
Os prebióticos são compostos, na sua maioria, por hidratos de carbono, utilizados como substratos por alguns microrganismos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que os utilizam mais rapidamente em comparação com os microrganismos patogénicos, favorecendo assim o seu desenvolvimento. Estes compostos são classificados, de acordo com o número de carbonos, em: dissacarídeos (2 C), oligossacarídeos (3-10 C) ou polissacarídeos (> 10 C). A maioria dos prebióticos são oligossacarídeos. Neste grupo incluem-se os fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), xilo-oligossacarídeos (XOS), oligossacarídeos da soja (SOS). No grupo dos polissacarídeos são de salientar as fibras, que podem ser solúveis ou insolúveis. As fibras solúveis são fermentadas rapidamente, enquanto que as fibras insolúveis são lentamente ou parcialmente fermentadas (Davani-Davari *et al.*, 2019).

Os prebióticos podem ser divididos em vários grupos (Crittenden and Playne, 2009): (i) não digeridos (ou apenas parcialmente digeridos), (ii) não absorvidos no intestino delgado, (iii) pouco fermentados por bactérias da cavidade oral, (iv) bem fermentados por bactérias intestinais aparentemente benéficas e (v) mal fermentadas por possíveis microrganismos intestinais. Os prebióticos mais usados na nutrição animal são: FOS, GOS, inulina, isomaltooligossacarídeos (IMO), XOS, laticol, lactulose, fibra de cereais. Ao projetar a composição de fórmulas prebióticas, a determinação de uma dosagem apropriada é essencial. A administração de prebióticos em quantidades superiores às recomendadas pode originar perturbações ao nível do TGI, como a flatulência e a diarreia. Por outro lado, uma grande vantagem de fórmulas prebióticas é poderem ser usadas por um longo período de tempo e preventivamente, sem efeitos adversos observados (Olveira and González-Molero, 2016).

Os prebióticos podem ser encontrados naturalmente em algumas plantas e em alguns alimentos, como por exemplo, cebola, mel, leite, alcachofra de Jerusalém, chicória. A concentração dos prebióticos nestes alimentos está compreendida entre 0,3 e 6% de peso fresco (peso imediatamente após a colheita), salientando-se a presença: lactulose (cerca de 40% de toda a produção), GOS, FOS, malto-oligossacarídeos, ciclodextrinas e lactossacarose (Khangwal and Shukla, 2019; Jovanovic-Malinovska *et al.*, 2014). Estas substâncias encontram-se em concentrações reduzidas nos produtos naturais, não permitindo por si obter resultados notáveis na produção animal. Desta forma, os prebióticos são cada vez mais sintetizados, usando métodos químicos e enzimáticos industriais (Slizewska *et al.*, 2013).

### II.3.1. Mecanismos de ação dos prebióticos

Considerando os prebióticos como promotores de crescimento na produção animal, estes compostos atuam essencialmente por dois mecanismos de ação diferentes (Figura 7): interação com as células e o sistema imunológico do hospedeiro e por modulação da microbiota intestinal do hospedeiro).



**Figura 7:** Mecanismo de ação dos prebióticos.

#### II.3.1.1. Interação com as células e o sistema imunológico do hospedeiro

A interação entre as células epiteliais e as bactérias origina a ativação da imunidade inata e da imunidade adquirida. Constatou-se que a ingestão de estirpes específicas de probióticos ou a ingestão oral de prebióticos estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-10 (IL-10) e TGF- $\beta$ , e a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , conseguindo aliviar a inflamação intestinal crônica (Holscher, 2017; Brosseau *et al.*, 2019).

#### II.3.1.2. Modulação da microbiota intestinal do hospedeiro

Os prebióticos favorecem o desenvolvimento de uma microflora benéfica. Adicionalmente, os prebióticos alcançam o TGI na forma não digerida, onde sofrem uma fermentação seletiva por algumas bactérias, por exemplo, *Bifidobacterium*,

Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

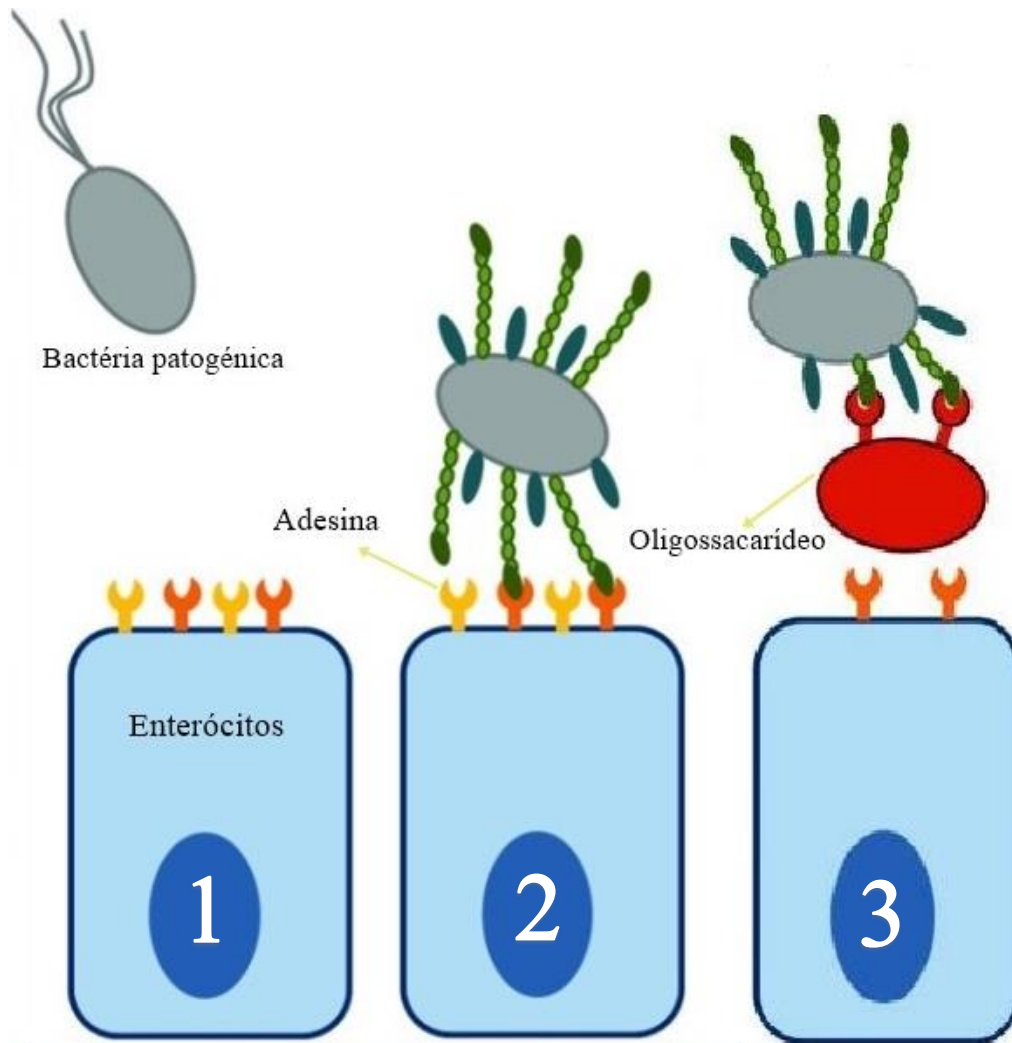
*Lactobacillus*, *Enterococcus faecium*, da qual resulta a produção de ácidos gordos voláteis de cadeia curta, ou seja, os ácidos acético, propiónico e butírico. Estes ácidos são responsáveis pela acidificação do meio, impedindo a proliferação de bactérias oportunistas, especialmente patogénicas, tais como *Escherichia coli*, *Clostridium spp.* e *Salmonella spp.*, que são sensíveis a ambientes ácidos e que não degradam tão bem e tão rápido os prebióticos acima descritos (Holscher, 2017).

### **II.3.1.3 Fonte energética das células epiteliais intestinais**

Tal como referido anteriormente, como resultado do processo de fermentação microbiana dos prebióticos produz-se ácidos gordos voláteis de cadeia curta. Estes ácidos são a fonte energética preferida dos enterócitos, especialmente o ácido butírico. Desta forma, verifica-se uma melhor manutenção da integridade da mucosa que atua como barreira para as bactérias e as endotoxinas (Pituch *et al.*, 2013).

### **II.3.1.4- Bloqueio da adesão das bactérias patogénicas à parede do intestino**

Muitas bactérias possuem adesinas ou lectinas superficiais, ou seja, proteínas com capacidade de unir-se, de forma específica, aos hidratos de carbono que formam parte da composição de alguns recetores presentes na membrana dos enterócitos. Esta etapa é considerada essencial para a patogénese destas bactérias. Alguns oligossacarídeos, que entram na composição dos prebióticos, são análogos estruturais destes hidratos de carbono, inibindo o processo de união da bactéria e, conseqüentemente, previnem as infeções causadas por estas bactérias e favorecem a sua eliminação (Figura 8) (Krachler and Orth, 2013).



**Figura 8:-** Mecanismo de ação do bloqueio da adesão bacteriana à parede intestinal. Etapas 1-2: processo normal de ligação da bactéria patogénica à célula epitelial; 3- ao adicionar prebióticos à alimentação vai deixar de ocorrer a ligação da bactéria patogénica.

### II.3.2 Estudos prebióticos

Xu *et al.* (2003) realizou um estudo, envolvendo 240 pintos machos, com um dia de idade, para avaliar os efeitos da suplementação de FOS nas atividades das enzimas digestivas, na microflora e na morfologia intestinal dos animais. Os animais foram aleatoriamente distribuídos por grupos de tratamento: um grupo recebeu uma dieta à base de farelo de milho e soja (grupo controlo) e nos outros grupos de animais foi adicionado FOS à dieta basal em diferentes concentrações (2,0; 4,0 e 8,0 g/Kg de ração), durante um período de 49 dias. A suplementação com FOS à dieta basal, numa concentração de 4 g/kg de ração, teve um efeito positivo no crescimento médio diário dos animais estudados e no crescimento das bactérias *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, com uma inibição simultânea do crescimento de *Escherichia coli* no TGI dos animais estudados. A suplementação de 4,0 g/kg de FOS melhorou significativamente as atividades da amilase e da protease total

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

em comparação com o grupo controlo. Os dados morfológicos do duodeno, jejuno e íleo não demonstraram diferenças significativas para a altura da vilosidade, profundidade da cripta ou altura da microvilosidade no duodeno. Por outro lado, a adição de 4,0 g/kg de FOS aumentou significativamente a altura das vilosidades ao nível do íleo, a altura da microvilosidade jejunal e do íleo e as proporções altura da vilosidade/profundidade da cripta no jejuno e íleo e diminuição da profundidade da cripta no jejuno e íleo. No entanto, a adição de 8,0 g/kg de FOS não teve efeito significativo no desempenho do crescimento, atividades de enzimas digestivas, microflora intestinal ou morfologia.

Baurhoo *et al.* (2007) conduziram um estudo em frangos para avaliar o efeito da lignina e mananoligossacarídeos (MOS) como promotores de crescimento e alternativas aos antibióticos. Os tratamentos dietéticos envolveram: (i) uma dieta à base de farelo de soja e milho (grupo controlo negativo); (ii) mesma dieta base suplementada com 11 mg de virginiamicina/kg (grupo controlo positivo); (iii) dieta base suplementada com MOS (0,2% até ao 21º dia e 0,1% depois); (iv) e (v) dieta base suplementada com 1,25% ou 2,5 de lignina, respetivamente. O peso corporal e o consumo de ração foram registrados semanalmente por um período de 38 dias. Aos 28 e 38 dias, o conteúdo cecal foi analisado para quantificação de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. O peso corporal e o consumo de ração não diferiram entre os tratamentos alimentares. No dia 38, a população de *Lactobacillus* foi superior ( $p < 0,05$ ) nas aves alimentadas com MOS, enquanto as aves alimentadas com suplemento de 1,25% de lignina apresentaram uma quantidade de *Bifidobacterium* superior ( $p < 0,05$ ) relativamente aos animais suplementados com antibiótico. A quantidade de *Bifidobacterium* foi também superior ( $p < 0,05$ ) em aves alimentadas com MOS ou lignina em comparação com aquelas suplementadas com antibiótico, tanto no dia 28 como no dia 38. O estudo demonstrou que uma dose prebiótica excessivamente alta pode ter um impacto negativo no sistema gastrointestinal e atrasar o processo de crescimento dos animais.

Tzortzis *et al.* (2005) analisaram 42 leitões desmamados, administrando-lhes GOS, numa concentração de 4% (m/m), durante um período de 34 dias. Os autores reportaram um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) da contagem de bactérias do género *Bifidobacterium* no conteúdo do cólon proximal e distal e da concentração de ácido acético, com redução simultânea do pH intestinal ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controlo (i.e leitões alimentados com dieta comercial isolada) e ao grupo de leitões cuja

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

dieta foi suplementada com inulina. Além disso, a suplementação com GOS causou forte inibição da adesão de *Escherichia coli* (ETEC) e de *Salmonella typhimurium*.

Ganguly (2013) avaliou o efeito da utilização de uma preparação da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* como imunomodulador da resposta imune inata. No estudo utilizou uma preparação comercial da parede celular de levedura, a qual foi administrada por via oral a frangos com 1 semana de vida, em quantidades de 0,4 g ou 0,8 g/kg de ração durante um período de 15 dias. Posteriormente, nos 20 dias seguintes, as aves voltaram à dieta de base. Os resultados foram comparados com um grupo controlo de aves mantidas em regime de alimentação não suplementada. Para a avaliação da imunidade inata procedeu-se à contagem dos neutrófilos, monócitos e linfócitos. Nos grupos das aves suplementadas, constatou-se um aumento significativo ( $p < 0,5$ ) da produção de superóxido pelos neutrófilos. No grupo de tratamento suplementado com 0,4 g da preparação comercial, verificou-se uma proliferação de linfócitos e da produção de IL-2, os quais posteriormente diminuíram abruptamente. No grupo suplementado com 0,8 g de preparação comercial, ocorreu uma proliferação de linfócitos e da produção de IL-2; contudo, a diminuição destes foi gradual. O autor concluiu que, uma administração oral da preparação da parede celular de leveduras em diferentes doses (0,4 ou 0,8 %), durante 15 dias, melhorou a resposta imune inata nos frangos.

#### **II.4. Simbióticos**

O termo “simbiótico” foi definido como sendo “uma mistura de probióticos e prebióticos que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e a implementação de suplementos alimentares microbianos vivos no TGI, estimulando seletivamente o crescimento e/ou ativação do metabolismo de uma ou de um número limitado de bactérias promotoras de saúde e, desta forma, melhorar o bem-estar do hospedeiro”. Os simbióticos caracterizam-se pelo uso combinado de prebióticos e probióticos de forma a agirem sinergicamente (Alloui *et al.*, 2013; Flesch *et al.*, 2014).

O recurso aos simbióticos baseia-se no facto de que a mistura de probióticos e prebióticos permite melhorar a sobrevivência e a colonização dos probióticos, conseqüentemente, ocorre uma promoção seletiva do crescimento e dos processos metabólicos realizados pelas bactérias no TGI, podendo trazer benefícios ao hospedeiro (Yadav *et al.*, 2016).

Os simbióticos fornecem exoenzimas bacterianas e induzem as enzimas digestivas do hospedeiro: a metabolização dos simbióticos ativa diretamente a biossíntese e enzimas no pâncreas e induz a secreção de enzimas digestivas no intestino.

Segundo um estudo realizado por Tayeri *et al.* (2018), envolvendo 308 frangos de corte, divididos por 5 grupos diferentes em termos de alimentação: (i) dieta basal (grupo controlo negativo), (ii) dieta basal suplementada com flavomicina, (iii) dieta basal suplementada com prebióticos, (iv) dieta basal suplementada com probióticos, (v) dieta basal suplementada simbióticos. O período de estudo correspondeu a 46 dias. Os autores constataram que as carcaças de frangos alimentados com suplemento de simbióticos alcançaram um ganho de peso superior em relação aos restantes promotores de crescimento e ao controlo negativo. A dieta suplementada com AB foi a que obteve um aumento de peso menor. Os autores concluíram que o uso de promotores de crescimento como os prebióticos, probióticos e simbióticos é favorável e bastante promissora.

## II.5. Enzimas exógenas

As enzimas exógenas são proteínas especializadas que catalisam reações químicas específicas, sendo que as digestivas aceleram a decomposição química de nutrientes em frações mais simples, melhorando a absorção destas (Thacker, 2013).

As bactérias e os fungos produzem várias enzimas através da fermentação. Estas enzimas são normalmente usadas nas dietas para aves domésticas, sendo as principais (Kiarie *et al.*, 2013; Adeola and Cowieson, 2011; Slominski, 2011): carbohidrases ( $\beta$  glucanase, xilanase, amilase,  $\alpha$ -galactosidase), protease, lipase e fitase. As enzimas apresentam como funções principais o aumento da digestibilidade, performance, saúde dos animais (Yadav and Jha, 2019).

A intervenção de enzimas nas dietas pode ser mediada por vários mecanismos de ação (Figura 9) (Choct, 2009; Kiarie *et al.*, 2013):

- Aumento da digestibilidade dos nutrientes que não são degradados pelas enzimas endógenas ou melhorar a digestão efetiva destas;
- Eliminação dos polissacarídeos da parede celular e, posterior, libertação de nutrientes como aminoácidos e minerais;
- Degradação de fatores anti-nutricionais, como os inibidores de proteases e fitatos, aumentando o valor nutricional dos ingredientes da ração;
- Aumento da solubilidade de polissacarídeos não amiláceos, para posterior fermentação intestinal, gerando energia;
- Suplementação de enzimas em animais jovens que têm uma produção deficiente de enzimas endógenas, uma vez que o seu sistema digestivo ainda não está totalmente desenvolvido.

## **II.5.1 Mecanismos de ação enzimas exógenas**

### **II.5.1.1 Aumento da digestibilidade dos nutrientes**

A suplementação das rações para aves com enzimas exógenas tem demonstrado ser uma estratégia promissora para melhorar a produção de carne, uma vez que aumentam a digestibilidade de alguns nutrientes e reduzem as suas perdas pelas fezes. Numa revisão, Alagawany *et al.* (2018) afirmaram que se não fosse a suplementação de enzimas, parte da ração fornecida às aves não iria ser degradada. Com esta estratégia ocorre um maior aproveitamento do alimento, tornando a alimentação mais económica, bem como reduz a perda de azoto e fósforo.

Zanella e seus colaboradores (1999) propuseram alterar a fórmula das rações, reduzindo os nutrientes e adicionando enzimas exógenas, com o intuito de obter os mesmos valores nutricionais disponíveis para os animais. Desta forma, avaliaram a digestibilidade das dietas à base de milho e farelo de soja ou de soja tratada por torrefação (suplementação enzimática melhorou a digestibilidade geral da proteína bruta em 2,9%; contudo, essa melhoria não foi semelhante para todos os aminoácidos. Dos aminoácidos mais importantes para os frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e soja, as digestibilidades da lisina, metionina e arginina não foram melhoradas ou a sua melhoria não foi significativa pela suplementação enzimática. Por outro lado, a digestibilidade da valina e do triptofano melhorou 2,3% e 3%, respetivamente. Adicionalmente, os autores demonstraram que a suplementação enzimática da dieta de base aumentou o peso corporal e a taxa de conversão alimentar em 1,9% e 2,2%, respetivamente. Os autores ainda demonstraram que a melhoria da utilização dos nutrientes provocada pela suplementação enzimática pode compensar um conteúdo energético reduzido da dieta.

Adicionalmente, Torres *et al.* (2003) estudaram em 819 frangos de corte, durante 42 dias, a influência da suplementação enzimática às dietas à base de milho e soja no desempenho produtivo dos animais. Para tal, os animais foram divididos em grupos de

21 aves aos quais foram administrados tratamentos dietéticos diferentes: a dieta basal constituída por soja e milho sem enzimas (grupo controlo) e nos outros grupos foram realizados 12 dietas diferentes com redução de conteúdo proteico e energético e adição de complexo enzimático (amilase, protease e xilanase) em 0,5; 1,0 e 1,5 g de enzima por kg de ração. Aos 28 dias, os autores verificaram, melhores resultados, em termos de ganho de peso, na dieta suplementada com o complexo enzimático na concentração de 1,0g/kg, a dieta continha menores níveis de proteína, mas suplementada com enzimas, forneceu aos frangos um desempenho semelhante aos das dietas com níveis normais de nutrientes sem afetar o desempenho e com redução de custos. Aos 42 dias, a utilização de enzimas exógenas não melhorou os rendimentos das carcaças dos frangos. As conclusões foram obtidas através de fórmulas, que relacionam o consumo de ração com o peso do animal, mantendo o desempenho das aves com níveis energéticos ou proteicos reduzidos. Assim, conclui-se que é possível formular rações com níveis mais baixos de nutrientes.

#### **II.5.1.2 Eliminação dos polissacarídeos da parede celular**

As enzimas podem alterar, indiretamente, a microbiota intestinal do animal por dois mecanismos de ação, designadamente, reduzindo os substratos não digeridos ou transformando os polissacarídeos não digeríveis da parede celular em oligossacarídeos de cadeia curta, tendo um papel semelhante ao já referido para os prebióticos (Kiarie *et al.*, 2013; Celi *et al.*, 2017).

#### **II.5.1.3 Degradação dos fatores anti-nutricionais**

Na alimentação dos animais, muitos compostos não são degradados na totalidade ou não são degradados pelas enzimas endógenas. Uma estratégia para digerir tais compostos é a adição de enzimas exógenas às dietas dos animais (Kiarie *et al.*, 2013).

As carbohidrases, como as xilanase, beta-glucanases e proteases, por exemplo, degradam os polissacarídeos não amiláceos, melhorando a absorção de nutrientes (Kiarie *et al.*, 2013).

A fitase é a enzima responsável por hidrolisar o fitato, presente nos alimentos de origem vegetal. Esta reação enzimática, já referida anteriormente, justifica o uso de fitase nas rações para diminuir a libertação de gases poluentes como dióxido de carbono, metano. Após a ação da fitase e libertação do fósforo do fitato este fica com menos

#### **II.5.1.4 Suplementação de enzimas exógenas em animais jovens**

A introdução de enzimas exógenas nas dietas aumenta a disponibilidade de vários nutrientes. Adicionalmente, descobriu-se que reduzindo a quantidade de nutrientes nas rações e acrescentando as enzimas exógenas, a quantidade de nutrientes disponíveis para os animais são as suficientes, poupando-se em alguns nutrientes na ração (Zanella *et al.*, 1999). Este mecanismo de ação pode ser comprovado pelo estudo de Zanella *et al.* (1999), apresentado anteriormente.

#### **II.5.1.5 Aumento da solubilidade de polissacarídeos não solúveis**

A utilização da xilanase melhora a saúde animal, uma vez que em aves cuja dieta seja à base de trigo, milho e soja, esta enzima atua sobre os polissacarídeos, degradando-os em oligossacarídeos. Estes compostos são usados mais eficazmente como substrato pelas bactérias benéficas, eliminando as bactérias patogénicas.

Persia *et al.* (2002) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação enzimática à dieta de perus em crescimento na disponibilidade de energia, no desaparecimento do amido ao longo do trato intestinal e na população da microflora cecal. Para tal, os animais foram alimentados com dietas à base de trigo ou milho como principal grão de cereal, com ou sem enzimas adicionadas à dieta. Os resultados revelaram um desaparecimento considerável do amido (80%), independentemente da suplementação enzimática e da fonte de cereais. As aves alimentadas com a dieta à base de trigo suplementada com enzima melhoraram a utilização da ração. Adicionalmente, os autores reportaram uma redução significativa na concentração de bactérias degradadoras de amido. O ácido láctico e o propionato produzido pelas bactérias benéficas tornam-se tóxicos para as bactérias patogénicas. Os autores concluíram que a suplementação

enzimática pode ser uma ferramenta para a manipulação dietética da microflora intestinal (Persia *et al.*, 2002).

## **II.6. Óleos essenciais**

Os óleos essenciais, denominados também por óleos voláteis, são obtidos através da extração de matéria-prima vegetal. Os óleos essenciais são compostos pelo líquido hidrófobo de substâncias odoríferas e compostos aromáticos voláteis de várias partes das plantas, como flores, folhas, casca, sementes e ramos (Nazzaro *et al.*, 2013).

Estes compostos podem ser classificados como óleos essenciais sintéticos ou naturais, sendo divididos em duas classes principais, os terpenos (carvacrol e timol) e os fenilpropenos (cinamaldeído e eugenol). Os terpenos são divididos de acordo com o número de anéis de 5 carbonos, ligações duplas, presença de estereoquímica e moléculas de oxigênio. Dentro da classe dos terpenos existem centenas de moléculas, já para os fenilpropenos o número é bem mais reduzido, cerca de 50. Apenas alguns óleos essenciais possuem propriedades antimicrobianas, sendo que os compostos mais utilizados são o timol, carvacrol e o eugenol (Mehdi *et al.*, 2018; Omonijo *et al.*, 2018).

### **II.6.1. Mecanismo de ação dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais têm várias propriedades, como por exemplo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes.

#### **II.6.1.1. Efeito anti-inflamatório**

O intestino exerce várias funções, nomeadamente: a absorção de água, eletrólitos, nutrientes; a secreção de citocinas, mucina, imunoglobulinas; e a proteção, formando uma barreira contra antígenos, toxinas e microrganismos patogênicos. Portanto, esta porção do TGI apresenta um papel importante no sistema imunológico (Lallès *et al.*, 2004). As células epiteliais podem detetar o início de uma resposta imune ou inflamação através das citocinas que transmitem a informação às células T e B, neutrófilos,

macrófagos e células dendríticas, causando posteriormente o processo inflamatório (Pitman and Blumberg, 2000).

A inflamação intestinal dos porcos afeta não só a integridade da parede intestinal, como também o desempenho no crescimento e a perda de peso. Omonijo *et al.* (2018) verificaram que o fator nuclear kappa B (NF-kB) e o fator nuclear (eritróide-2) relacionado com o fator 2 expressão (Nrf2) são fatores de transcrição que, depois de ativados por vários indutores pró-inflamatórios, migram do citoplasma para o núcleo e induzem a expressão de várias proteínas pró-inflamatórias. Os óleos essenciais atuam nesta fase, inibindo a migração destes fatores e a sucessiva produção de agentes pró-inflamatórios (Omonijo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015).

#### **II.6.1.2. Efeito anti-oxidante**

O stress oxidativo proporciona danos biológicos, que, por sua vez, podem afetar o crescimento, o desempenho e a saúde em suínos. Os porcos são frequentemente expostos a vários mecanismos de stress, incluindo no período do desmame, desnutrição, doenças, temperaturas elevadas, contaminações da alimentação por micotoxinas, transporte e superlotação. Estas situações resultam num aumento da produção de espécies reativas ao oxigénio (Omonijo *et al.*, 2018). A presença de óleos essenciais inibe a produção de espécies reativas ao oxigénio nas células epiteliais do intestino delgado. Posteriormente, o Nrf2 pode ser dissociado da proteína e deslocar-se até ao núcleo para ativar a produção dos genes que codifiquem para a produção de enzimas antioxidantes, como por exemplo, superóxido dismutase, glutathione redutase, catalase. Estas enzimas ajudam a restabelecer o equilíbrio da célula. Baseados nestes acontecimentos, os óleos essenciais têm sido considerados uma mais valia para evitar o stress oxidativo e restabelecer o equilíbrio nas células epiteliais (Yang *et al.*, 2015).

#### **II.6.1.3. Efeito antimicrobiano**

A concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais corresponde à concentração mínima de óleo essencial que inibe a proliferação da bactéria. A CMI de óleo essencial varia de espécie para espécie (Tabela 2). Os óleos essenciais atuam sobre

os ácidos gordos da parede celular, sensibilizando-as e causando danos significativos, que podem resultar no colapso da integridade da membrana citoplasmática bacteriana, com conseqüente esvaziamento do conteúdo intracelular. Estes acontecimentos podem culminar na morte das células devido à coagulação citoplasmática, eliminação de proteínas da membrana celular, diminuição da produção de ATP e ATPases, alteração da morfologia celular, alteração da força motriz dos prótons (Nazzaro *et al.*, 2013).

**Tabela 2:** Concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais nas várias bactérias. Adaptado de (Yang *et al.*, 2015; Omonijo *et al.*, 2018).

| Óleo essencial     | Microrganismo patogénico     | Gram       | CMI                              | Referência                         |
|--------------------|------------------------------|------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Timol              | Lactococcus piscicum         | +          | 320 mg/L                         | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010)   |
|                    | Streptococcus phocae         | +          | 640 mg/L                         | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010)   |
|                    | Flavobacterium psychrophilum | -          | 320 mg/L                         | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010)   |
|                    | Vibrio anguillarum           | -          | 80 mg/L                          | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010)   |
|                    | Vibrio parahaemolyticus      | -          | 320 mg/                          | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010)   |
|                    | Pseudomonas sp               | -          | 640 mg/L                         | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010)   |
|                    | Brachyspira hyodysenteriae   | -          | 1.25 mmol/L                      | (Vande Maele <i>et al.</i> , 2016) |
|                    | Escherichia coli 0157:H7     | -          | 166 µg/mL                        | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                    | Salmonella Typhimurium       | -          | 233 µg/mL                        | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                    | DT104                        |            |                                  |                                    |
|                    | Escherichia coli K88         | -          | 100 µg/mL                        | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
| Lactococcus lactis | +                            | 1.280 mg/L | (Navarrete <i>et al.</i> , 2010) |                                    |
| Eugenol            | Vibrio sp                    | -          | 156 µg/mL                        | (Lee <i>et al.</i> , 2009)         |
|                    | Escherichia coli             | -          | 625 µg/mL                        | (Lee <i>et al.</i> , 2009)         |
|                    | Salmonella                   | -          | 156 µg/mL                        | (Lee <i>et al.</i> , 2009)         |
|                    | Pseudomonas sp               | -          | 325 µg/mL                        | (Lee <i>et al.</i> , 2009)         |
|                    | Edwardsiella tarda           | -          | 56-125 µg/mL                     | (Lee <i>et al.</i> , 2009)         |
|                    | Aeromonas hydrophilla        | -          | 625 µg/mL                        | (Lee <i>et al.</i> , 2009)         |

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

| <b>Óleo essencial</b> | <b>Microrganismo patogénico</b> | <b>Gram</b> | <b>CMI</b>  | <b>Referência</b>                  |
|-----------------------|---------------------------------|-------------|-------------|------------------------------------|
|                       | Brachyspira hyodysenteriae      | -           | 2.5 mmol/L  | (Vande Maele <i>et al.</i> , 2016) |
|                       | Escherichia coli 0157:H7        | -           | 466 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | Salmonella Typhimurium          | -           | 400 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | DT104                           |             |             |                                    |
|                       | Escherichia coli K88            | -           | 300 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
| Carvacrol             | Listonella anguillarum          | -           | 25 µg/mL    | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | Brachyspira hyodysenteriae      | -           | 1.25 mmol/L | (Vande Maele <i>et al.</i> , 2016) |
|                       | Escherichia coli 0157:H7        | -           | 283 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | Salmonella Typhimurium          | -           | 167 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | DT104                           |             |             |                                    |
|                       | Escherichia coli K88            | -           | 100 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
| Cinamaldeíd           | Brachyspira hyodysenteriae      | -           | 0.31 mmol/L | (Vande Maele <i>et al.</i> , 2016) |
| o                     | Escherichia coli 0157:H7        | -           | 133 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | Salmonella Typhimurium          | -           | 100 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |
|                       | DT104                           |             |             |                                    |
|                       | Escherichia coli K88            | -           | 133 µg/mL   | (Si <i>et al.</i> , 2006)          |

O carvacrol e o timol devido às suas propriedades hidrófobas conseguem facilmente penetrar nas cadeias de ácidos gordos das membranas das bactérias constituídas por fosfolípidos, fazendo com que estas se expandam e se tornem mais fluídas, facilitando a entrada dos antimicrobianos (Omonijo *et al.*, 2018).

### **III. Sinergismo entre os vários promotores de crescimento**

Na produção animal tem-se investigado a associação entre as várias estratégias alternativas para promover o crescimento dos animais com o intuito de se obter um efeito sinérgico dos compostos. As associações mais reportadas da literatura são entre os ácidos orgânicos e os óleos essenciais e entre as enzimas digestivas e os prebióticos.

#### **III.1. Sinergismo entre ácidos orgânicos e óleos essenciais**

Omonijo e seus colaboradores reportaram que as adições de óleos essenciais com ácidos orgânicos às dietas dos animais produzem um efeito sinérgico. As paredes celulares das bactérias Gram + são constituídas por peptidoglicanos, o que facilita a penetração de compostos hidrófobos. As bactérias Gram – são constituídas por uma membrana externa espessa que dificulta a penetração dos óleos essenciais. Desta forma, as bactérias Gram – possuem uma maior resistência aos óleos essenciais quando comparados com as bactérias Gram + (Omonijo *et al.*, 2018). De acordo com estes autores, o mecanismo de ação do sinergismo entre os óleos essenciais e os ácidos orgânicos ainda não está completamente esclarecido. Contudo está bem descrito que o composto fenol encontrado nos óleos essenciais, consegue alterar a estrutura da membrana celular, aumentando a sua permeabilidade e a suscetibilidade da bactéria aos ácidos orgânicos. Com a descida do pH, devido à presença dos ácidos orgânicos, há o aumento da hidrofobicidade dos óleos essenciais, permitindo uma melhor passagem pelos lípidos da membrana celular bacteriana.

Bastos-Leite *et al.* (2016) realizaram um estudo envolvendo 360 aves, durante um período de 63 dias. Os animais foram divididos em grupos e submetidos a diferentes tratamentos dietéticos: (i) ração sem promotor de crescimento (grupo controlo negativo); (ii) ração suplementada com virginiamicina; (iii) a ração suplementada com ácidos orgânicos; (iv) ração suplementada com ácidos orgânicos e óleos essenciais. Os autores avaliaram o peso médio e o comprimento dos intestinos. Em termos de peso médio, os resultados foram mais favoráveis para os animais inseridos no grupo (ii), com um ganho de 818,90g/ave, ainda que os resultados dos tratamentos do grupo (iii) (787,23g/ave) e do grupo (iv) (785,39g/ave) não tenham sido muito diferentes. Os autores apontaram várias

razões para que estes resultados não tenham sido favoráveis às alternativas ao uso do antibiótico, nomeadamente, o facto de as aves não terem sido colocadas em situações extremas de stress, não terem estado em contacto com as fezes, condições ambientais favoráveis, o espaço onde foram criadas ser amplo. Contudo, e atendendo à proibição dos antibióticos como promotores de crescimento na produção animal, os autores concluíram que a utilização dos ácidos orgânicos, isoladamente ou em associação com os óleos essenciais, representa uma alternativa eficaz, uma vez que os resultados de produção seriam idênticos (Bastos-Leite *et al.*, 2016).

### **III.2 Sinergismo entre enzimas exógenas e prebióticos**

Hoje em dia, é comum os produtores de aves e suínos recorrerem a enzimas para digerirem os polissacarídeos não amiláceos, ou seja, compostos que as enzimas endógenas não conseguem digerir, e para degradar as paredes celulares de algumas fibras que contêm no seu interior nutrientes aprisionados. Alguns exemplos dessas enzimas incluem: xilanase, beta-glucanase, alfa-galactosidase e pectinase (Kiarie *et al.*, 2013)

Foi realizado um estudo em frangos de corte, em que foi adicionado xilanase, que resultou num aumento de 5 vezes mais de ácidos gordos de cadeia curta. Num outro estudo, realizado em suínos desmamados precocemente, os autores determinaram o efeito da suplementação de uma dieta à base de trigo com xilanase e fosfolipase, isoladamente ou em combinação, na digestibilidade dos nutrientes e energia. Os autores concluíram que a combinação de ambas a enzima, de um modo geral, aumentou mais a digestibilidade ao nível do fêlo (aproximadamente 2%). Contudo, numa base relativa, este aumento de 2% representa aproximadamente 13% da dieta restante que estava disponível para digestão, uma vez que aproximadamente 15% da dieta não foi digerida nos porcos incluídos no grupo controlo (dieta sem suplementação enzimática). Assim, os benefícios potenciais na nutrição de porcos desmamados a partir de combinações de enzimas devem ser validados em condições práticas (Diebold *et al.*, 2004).

Foi realizado um estudo em que se adicionou NSPases, para degradar os polissacarídeos não amiláceos em ácidos gordos de cadeia curta, mas verificou-se que com a elevada concentração de ácidos gordos de cadeia curta, automaticamente a população de lactobacilos aumentou (Diebold *et al.*, 2004). Em galinhas a população de

enterobactereaceas reduziu quando as galinhas foram alimentadas por ração com enzimas que degradam os polissacarídeos não amiláceos (Józefiak *et al.*, 2010).

### III.3 Sinergismo entre ácidos orgânicos e enzimas exógenas

Este efeito foi comprovado num estudo realizado em frangos (Nezhad *et al.*, 2011). Neste estudo, os autores avaliaram os efeitos combinados do ácido cítrico e da fitase microbiana na digestibilidade do cálcio e do fósforo e na mineralização do osso da tíbia. Neste estudo, 4 réplicas de 15 pintos foram alimentadas com diferentes tratamentos dietéticos, nomeadamente: (i) dieta basal deficiente em fósforo (grupo controlo), (ii) dieta basal deficiente em fósforo + 500 FTU (unidade de atividade de fitase)/Kg de dieta; (iii) dieta basal deficiente em fósforo + 2,5 % de ácido cítrico/Kg de dieta; (iv) dieta basal deficiente em fósforo + 500 FTU + 2,5 % de ácido cítrico/Kg de dieta, (v) dieta basal deficiente em fósforo + 5 % de ácido cítrico/Kg de dieta; (iv) dieta basal deficiente em fósforo + 500 FTU + 5 % de ácido cítrico/Kg de dieta. Os resultados demonstraram que a interação entre o ácido cítrico e a fitase microbiana, nas dietas com baixo teor de fósforo, apresentou um efeito significativo ( $p < 0,01$ ) para o conteúdo de cálcio na tíbia. A adição de ácido cítrico às dietas com deficiência de fósforo aumentou o teor de fósforo na tíbia dos frangos quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, a adição de ácido cítrico às dietas de frango deficientes em fósforo disponível aumentou significativamente a digestibilidade do fósforo ( $p < 0,01$ ) e o comprimento da tíbia ( $p < 0,001$ ) quando comparado aos animais no grupo controlo. Os autores concluíram que a adição de fitase microbiana às dietas com baixo teor de fósforo pode melhorar a utilização do fósforo presente no fitato. Além disso, a adição de ácido cítrico como quelante à dieta pode melhorar os parâmetros de mineralização da tíbia em frangos de corte, i.e. promove a absorção de minerais, como o fósforo e o cálcio, impedindo que estes sejam excretados.

#### **IV. Conclusão**

O principal objetivo desta dissertação foi realizar uma pesquisa seletiva sobre as novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento animal, em alternativa aos compostos proibidos por legislação. Dentro de cada grupo de compostos foram caracterizados e apresentados os respectivos mecanismos de ação, bem como, os estudos envolvendo os animais de produção.

Através do estudo das várias estratégias alternativas utilizadas como promotores de crescimento animal é possível concluir que existem alternativas que apresentam resultados, em termos de crescimento e índice de conversão, superiores aos AB, que eram usados para o mesmo efeito e que contribuíram para o aumento da resistência bacteriana. As alternativas exploradas neste trabalho baseadas em evidências científicas incluem os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas exógenas, simbióticos, óleos essenciais e misturas entre estes que promoveram um efeito sinérgico.

Mediante os estudos apresentados, é difícil afirmar que um promotor é melhor que o outro, pois cada um atua de forma diferente no organismo do animal. Contudo, é possível sugerir algumas junções de promotores de crescimento, porque ao atuarem através de mecanismos de ação diferentes, ou, até mesmo, possuírem uma ação sinérgica, podem contribuir para um bom crescimento do animal.

Depois de se ter estudado as várias alternativas aos promotores de crescimento, concluiu-se que, para uma produção animal rápida e eficaz, o ideal seria a combinação entre vários promotores. Os simbióticos permitem manter uma flora intestinal homogênea e, com isso, evitar a aderência de bactérias patogênicas às paredes do epitélio intestinal, fornecer energia às células epiteliais e gerar uma maior área de absorção de nutrientes para o animal. Os ácidos orgânicos produzem uma redução do pH estomacal em alguns animais jovens, e, com isso, conseguem ativar as enzimas responsáveis por degradar as proteínas e eliminar bactérias patogênicas que são sensíveis a pH ácidos. Eventualmente, a adição de enzimas exógenas para promover uma maior digestibilidade da dieta e degradar possíveis polissacarídeos não amiláceos para posterior libertação de aminoácidos e nutrientes que estejam no seu interior. Os óleos essenciais apresentam atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, pois as suas propriedades hidrófobas vão destabilizar os ácidos gordos das membranas das bactérias criando uma instabilidade e,

## Novas estratégias utilizadas como promotores de crescimento na produção animal

posterior, passagem para o interior das bactérias, dependendo das concentrações podem promover a inativação de enzimas essenciais à produção de energia. Podem atuar em sinergismo com os ácidos orgânicos, facilitando a entrada destes para o citoplasma das bactérias, colocando em prática o seu mecanismo de ação antimicrobiano.

Os benefícios do processamento de alimentos em termos de desempenho animal e economia não são questionáveis. No futuro inovações estão prometidas, como o melhoramento da digestibilidade, desnaturação de proteínas.

Estima-se que as enzimas que virão a ser produzidas no futuro, sejam cada vez mais próximas da perfeição, isto é, com atividade catalítica mais rápida e mais eficaz. Uma melhor resistência à proteólise, à termoestabilidade e melhoramento do rendimento enzimático a uma maior gama de pH intestinal. Com a evolução das práticas de produção em animais, em termos de otimização da utilização de nutrientes, em termos da higiene dos alimentos para animais, eficácia dos aditivos alimentares, saúde animal e segurança alimentar, o crescimento mais rápido e saudável dos animais, com os novos promotores de crescimento torna-se mais fácil, sem a necessidade de recorrer aos AB.

## Referências

- Adeola, O. and Cowieson, A. (2011). Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Science*, 89 (10), pp. 3189-3218.
- Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., *et al.* (2010). Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, 4, pp. 479-485.
- EMA. (2019). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*. pp. 10-12.
- Alagawany, M., Elnesr, S. S. and Farag, M. R. (2018). The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19, pp. 157-164.
- Angelakis, E. (2017). Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*, 106, pp. 162-170.
- Bagal, V. L., Khatta, V. K., Tewatia, B. S., *et al.* (2016). Relative efficacy of organic acids and antibiotics as growth promoters in broiler chicken. *Veterinary World*, 9 (4), pp. 377-382.
- Bai, S. P., Wu, A. M., Ding, X. M., *et al.* (2013). Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science*, 92 (3), pp. 663-670.
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., *et al.* (2016). Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. *FAO Animal Production and Health Paper*, 179, pp. 1-64.
- Baldwin, S., Hughes, R. J., Hao Van, T. T., *et al.* (2018). At-hatch administration of probiotic to chickens can introduce beneficial changes in gut microbiota. *PLoS One*, 13 (3), [n.p.] doi: 10.1371.

- Bastos-Leite, S. C., Alves, E. H. A. and Sousa, A. M. D. (2016). Ácidos orgânicos e óleos essenciais sobre o desempenho, biometria de órgãos digestivos e reprodutivos de frangas de reposição. *Acta Veterinaria Brasilica*, 10 (3), pp. 201-207.
- Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X., *et al.* (2007). Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and *Escherichia coli* populations after in vivo *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry Science*, 86 (12), pp. 2509-2516.
- Beachey, E. H. (1981). Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*, 143, pp. 325-345.
- Bedford, A. and Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition*, 4 (2), pp. 151-159.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., *et al.* (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61 (2), pp. 160-174.
- Bertechini, A. G. (2012). *Nutrição de monogástricos*. Lavras: UFLA. pp. 373.
- Bierbaum, G. and Sahl, H.-G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10, pp. 2-18.
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., *et al.* (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12 (5), pp. 303.
- Blank, R., Mosenthin, R., Sauer, W., *et al.* (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 (11), pp. 2974-2984.
- Boatman, M. (1998). Survey of antimicrobial usage in animal health in the European union. *FEDESA*.
- Borges, T. D. (2016). Impacto do estresse no bem-estar dos animais e na qualidade da carcaça e da carne. Tese de doutoramento em zootecnia. Universidade estadual paulista- UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
- Brosseau, C., Selle, A., Palmer, D. J., *et al.* (2019). Prebiotics: Mechanisms and Preventive Effects in Allergy. *Nutrients*, 11 (8), pp. 1841.

- Busanello, M. (2012). Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. *Scientia Agraria Paranaensis*, 11 (4), pp. 14-24.
- Canibe, N., Steien, S. H., Overland, M., *et al.* (2001). Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *Journal of Animal Science*, 79 (8), pp. 2123-2133.
- Castanon, J. I. R. (2007). History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, 86 (11), pp. 2466-2471.
- Celi, P., Cowieson, A. J., Fru-Nji, F., *et al.* (2017). Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 234, pp. 88-100.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C., *et al.* (1991). Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. In: Rose, A. H. and Tempest, D. W. (Eds.) *Advances in Microbial Physiology*. New York: Academic Press, Vol. 32, pp. 87-108.
- Choct, M. (2009). Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science*, 50 (1), pp. 9-15.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., *et al.* (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31 (Sup. 1), pp. 99-118.
- Crittenden, R. and Playne, M. (2009). Prebiotics. In: Lee, Y.K. and Seppo, S. (Eds.) *Handbook of probiotics and prebiotics*. New Jersey: John Wiley & Sons, pp. 535-584.
- Czerwiński, J., Højberg, O., Smulikowska, S., *et al.* (2010). Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. *British Poultry Science*, 51 (2), pp. 258-269.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., *et al.* (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8 (3), pp. 92.

- Dibner, J. J. and 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 (4), pp. 453-463.
- Diebold, G., Mosenthin, R., Piepho, H.-P., *et al.* (2004). Effect of supplementation of xylanase and phospholipase to a wheat-based diet for weanling pigs on nutrient digestibility and concentrations of microbial metabolites in ileal digesta and feces. *J Anim Sci*, 82, pp. 2647-2656.
- EMA. (2019). *Antimicrobial resistance in veterinary medicine*. [Em linha]. Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance-veterinary-medicine> [Consultado em 29/10/2019].
- Engberg, R. M., Hedemann, M. S., Leser, T. D., *et al.* (2000). Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science*, 79 (9), pp. 1311-1319.
- Ezema, C. (2013). Probiotics in animal production: A review. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 5 (11), pp. 308-316.
- Flesch, A. G. T., Poziomyck, A. K. and Damin, D. D. C. (2014). The therapeutic use of symbiotics. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 27, pp. 206-209.
- Forbes, R. M., Parker, H. M. and Erdman Jr, J. W. (1984). Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *The Journal of Nutrition*, 114 (8), pp. 1421-1425.
- Forgetta, V., Rempel, H., Malouin, F., *et al.* (2012). Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. *Poultry Science*, 91 (2), pp. 512-525.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66, pp. 365-378.
- Ganguly, S. (2013). Supplementation of prebiotics, probiotics and acids on immunity in poultry feed: A brief review. *World's Poultry Science Journal*, 69 (3), pp. 639-648.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., *et al.* (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)

consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14 (8), pp. 491.

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., *et al.* (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17 (2), pp. 259-275.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125 (6), pp. 1401-1412.

Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., *et al.* (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Function Foods*, 7 (2), pp. 1-19.

Giesting, D. W. and Easter, R. A. (1985). Response of starter pigs to supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids. *Journal of Animal Science*, 60 (5), pp. 1288-1294.

Goodarzi Boroojeni, F., Vahjen, W., Mader, A., *et al.* (2014). The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science*, 93 (6), pp. 1440-1452.

Guillot, J. (2000). The pros and cons of probiotics-make probiotics work for poultry. *World Poultry*, 16 (7), pp. 18-21.

Harada, E., Kiriyaama, H., Kobayashi, E., *et al.* (1988). Postnatal development of biliary and pancreatic exocrine secretion in piglets. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 91 (1), pp. 43-51.

Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8 (2), pp. 172-184.

Huyghebaert, G. (2003). Replacement of antibiotics in poultry. *Eastern Nutrition Conference*, pp. 1-23.

- Huyghebaert, G., Ducatelle, R. and Immerseel, F. V. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187 (2), pp. 182-188.
- Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S. and Winkelhausen, E. (2014). Oligosaccharide profile in fruits and vegetables as sources of prebiotics and functional foods. *International Journal of Food Properties*, 17 (5), pp. 949-965.
- Józefiak, D., Rutkowski, A., Kaczmarek, S., *et al.* (2010). Effect of  $\beta$ -glucanase and xylanase supplementation of barley- and rye-based diets on caecal microbiota of broiler chickens. *British Poultry Science*, 51, pp. 546-557.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., *et al.* (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin research*, 32, pp. 179-205.
- Khan, R., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., *et al.* (2012). Garlic (*Allium sativum*) supplementation in poultry diets: Effect on production and physiology. *World's Poultry Science Journal*, 68 (3), pp. 417-424.
- Khangwal, I. and Shukla, P. (2019). Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27 (3), pp. 649-656.
- Kiarie, E., Romero, L. F. and Nyachoti, C. M. (2013). The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. *Nutrition Research Reviews*, 26 (1), pp. 71-88.
- Knarreborg, A., Lauridsen, C., Engberg, R. M., *et al.* (2004). Dietary antibiotic growth promoters enhance the bioavailability of  $\alpha$ -tocopheryl acetate in broilers by altering lipid absorption. *The Journal of Nutrition*, 134 (6), pp. 1487-1492.
- Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87 (2), pp. S193-S197.
- Krachler, A. M. and Orth, K. (2013). Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*, 4 (4), pp. 284-294.

- Lallès, J.-P., Boudry, G., Favier, C., *et al.* (2004). Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research*, 53 (4), pp. 301-316.
- Lee, S., Najiah, M., Wendy, W., *et al.* (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China*, 3, pp. 332-336.
- Liem, A., Pesti, G. and Edwards Jr, H. (2008). The effect of several organic acids on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chicks. *Poultry Science*, 87 (4), pp. 689-693.
- Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 (3659), pp. 747-748.
- Mani-López, E., García, H. S. and López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45 (2), pp. 713-721.
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., *et al.* (2010). *Animal Nutrition*. 7, pp. 44-81.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., *et al.* (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4 (2), pp. 170-178.
- Metzler, B. and Mosenthin, R. (2007). Effects of organic acids on growth performance and nutrient digestibilities in pigs. In: Lückstädt, C. (Ed.) *Acidifiers in Animal Nutrition: A Guide for Feed preservation and Acidification to Promote Animal Performance*. Nottingham: Nottingham University Press, pp. 39-54.
- Moore, P., Evenson, A., Luckey, T., *et al.* (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *Journal of Biological Chemistry*, 165, pp. 437-441.
- Morelli, L. and Capurso, L. (2012). FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46 (Sup. 1-2), pp. S1-S2.

- Nava, G. M., Attene-Ramos, M. S., Gaskins, H. R., *et al.* (2009). Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Veterinary Microbiology*, 137 (3-4), pp. 345-353.
- Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., *et al.* (2010). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41, pp. e667-e678.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., *et al.* (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6 (12), pp. 1451-1474.
- Nezhad, Y. E., Gale-Kandi, J. G., Farahvash, T., *et al.* (2011). Effect of combination of citric acid and microbial phytase on digestibility of calcium, phosphorous and mineralization parameters of tibia bone in broilers. *African Journal of Biotechnology*, 10 (66), pp. 15089-15093.
- Nunes, I. J. (1998). Nutrição animal básica. . *Revista Aumentada*, 2, pp.
- Ohland, C. L. and MacNaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298, pp. G807-G819.
- Olveira, G. and González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 63 (9), pp. 482-494.
- Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., *et al.* (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4, pp. 126-136.
- Øverland, M., Kjos, N., Borg, M., *et al.* (2007). Organic acids in diets for entire male pigs. *Livestock Science*, 109 (1-3), pp. 170-173.
- Penz Jr., A., Silva, A. D. and Rodrigues, O. (1993). Ácidos orgânicos na alimentação de aves. In: *Conferência APINCO'93 de ciência e tecnologias avícolas*, Santos: APINCO. p.111-119.
- Persia, M. E., Dehority, B. A. and Lilburn, M. S. (2002). The Effects of Enzyme Supplementation of Corn and Wheat-Based Diets on Nutrient Digestion and Cecal Microbial Populations in Turkeys. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11 (2), pp. 134-145.

- Petersen, S. (2001). Propriedades e características de Ronozime™ P, a nova fitase da Roche. In: *Simpósio Roche de nutrição animal*. Campinas: Roche, pp. 17-30.
- Pitman, R. S. and Blumberg, R. S. (2000). First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *Journal of Gastroenterology*, 35 (11), pp. 805-814.
- Pituch, A., Walkowiak, J. and Banaszkiwicz, A. (2013). Butyric acid in functional constipation. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 8 (5), pp. 295-298.
- Previdello, B. A. F., Fernando Rodrigues de, C., Tessaro, A., *et al.* (2006). O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos coloidais. *Química Nova*, 29 (3), pp. 600-606.
- Roth, L. (2000). The battle of the bugs - the direct fed microbial concept. *Pig Progress*, 6, pp. 12-15.
- Ruffino, L. M. (2013). *Ácidos orgânicos e fitase em rações para leitões desmamados*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Brasil.
- Selle, P. H., Ravindran, V., Caldwell, A., *et al.* (2007). Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*, 13 (2), pp. 255-278.
- Shamlo, R., Nasr, J. and Kheiri, F. (2014). Effects of various levels of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) on carcass characteristics and serum cholesterol in broiler. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 4 (8), pp. 453-457.
- Si, W., Gong, J., Chanas, C., *et al.* (2006). In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *Journal of Applied Microbiology*, 101, pp. 1282-1291.
- Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleeer, P., *et al.* (2017). Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, pp. 387.
- Skřivanová, E., Marounek, M., Benda, V., *et al.* (2006). Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinární medicína*, 51 (3), pp 81-88.

- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5 (4), pp. 1417-1435.
- Slizewska, K., Nowak, A., Barczynska, R., *et al.* (2013). Prebiotyki-definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 1 (86), pp. 5-20.
- Slominski, B. A. (2011). Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*, 90 (9), pp. 2013-2023.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15, pp. 99-111.
- Suiryanrayna, M. V. and Ramana, J. V. (2015). A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6 (1), pp. 45.
- Tayeri, V., Seidavi, A., Asadpour, L., *et al.* (2018). A comparison of the effects of antibiotics, probiotics, synbiotics and prebiotics on the performance and carcass characteristics of broilers. *Veterinary Research Communications*, 42 (3), pp. 195-207.
- Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4 (1), pp. 35.
- Torres, D. M., Teixeira, A. S., Rodrigues, P. B., *et al.* (2003). Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciência e Agrotecnologia*, 27 (6), pp. 1401-1407.
- Tsiloyiannis, V., Kyriakis, S., Vlemmas, J., *et al.* (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, 70 (3), pp. 287-293.
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gee, J. M., *et al.* (2005). A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *The Journal of Nutrition*, 135 (7), pp. 1726-1731.

- Vande Maele, L., Heyndrickx, M., Maes, D., *et al.* (2016). In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to organic acids and essential oil components. *The Journal of veterinary medical science*, 78, pp. 325-328.
- Von Engelhardt, W., Rönnau, K., Rechkemmer, G., *et al.* (1989). Absorption of short-chain fatty acids and their role in the hindgut of monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 23 (1-3), pp. 43-53.
- Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42 (1), pp. 8-12.
- Xu, Z., Hu, C., Xia, M., *et al.* (2003). Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science*, 82 (6), pp. 1030-1036.
- Yadav, A. S., Kolluri, G., Gopi, M., *et al.* (2016). Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry-A review. *Journal of Experimental Biology*, 4 (3Sup.), pp. 368-383.
- Yadav, S. and Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, pp. 2.
- Yang, C., Chowdhury, M. A. K., Huo, Y., *et al.* (2015). Phytogetic Compounds as Alternatives to In-Feed Antibiotics: Potentials and Challenges in Application. *Pathogens*, 4 (1), pp. 137-156.
- Zanella, I., Sakomura, N., Silversides, F., *et al.* (1999). Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, 78 (4), pp. 561-568.
- Zurita, A. Z., Mora, M. J. R. (2003). Capítulo 2.2. Promotores del crecimiento. *In: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Medicamentos de uso animal. Módulo I, Plan Nacional de Formación Continuada.* pp. 167-192.