RAFAEL FRANÇOSO

Óleos essenciais na alimentação de equinos

Pirassununga
2012

RAFAEL FRANÇOSO

Óleos essenciais na alimentação de equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso

Pirassununga

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
27/6/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2600
FMVZ

Françoso, Rafael

Óleos essenciais na alimentação de equinos / Rafael Françoso. -- 2012.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal,
Pirassununga, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso.

1. Carvacrol. 2. Digestibilidade. 3. Glicose. 4. Insulina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Utilização de óleos essenciais em equinos", protocolado sob o nº 2453/2011, utilizando 8 (oito) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research "Use of essential oils in horses", protocol number 2453/2011, utilizing 8 (eight) horses, under the responsibility Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

São Paulo, 24 de novembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: **FRANÇOSO, Rafael**

Título: **Óleos essenciais na alimentação de equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho a minha família,
aos meus amigos, parceiros de trabalho,
e todos que contribuíram,
pois realizei um grande sonho,
obrigado Deus.*

Agradecimentos

Agradeço principalmente a Deus pela realização de um grande objetivo da minha vida.

Aos meus familiares, pai Pedro Genésio, irmãos Jonas e Gilzinho, tios Carlito, Roberto e Gilberto, tias Valquíria, Elaine e Lourdes, primos Karla, Lucas, Pedro Arthur, Mariah e minha companheira Raquel, por todo carinho, paciência, incentivo, preocupação, apoio e amor dispensados a mim.

Ao meu orientador Alexandre Gobesso, por permitir, acreditar, e fornecer condições para realização desse trabalho; muito obrigado pela paciência, conhecimentos transmitidos, experiências profissionais e principalmente de vida compartilhados nesse período; agradeço também a todas outras oportunidades que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Marcos Veiga, Luis Felipe e Francisco Rennó por participarem da minha banca de egresso na pós-graduação, pois consequentemente fazem parte desse sonho realizado.

Aos parceiros que colaboraram com a execução do projeto, Iaçanã, Fernanda, Thiago, Zé Ésler, Jefferson, Júlia, Fernanda (Tim), Yasmin e a todos os estagiários que contribuíram para conclusão do projeto.

Ao Laboratório de Bromatologia da FZEA-USP, funcionários Rose e Rafael.

Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Ao Professor Eduardo Birgel Junior por fornecer seu laboratório e equipamento para realização das análises, sua esposa Daniela.

Aos funcionários da Equideocultura que muito me ajudaram Valdir e Ruberlei.

Meus companheiros de moradia, Eduardo (Dudu), Melina e Flávio pelos anos de convivência e amizade.

Aos amigos que ganhei nessa fase da minha vida, Iaçanã, Fernanda, Maria, Bisão, Jefferson, Zé Ésler, Thiago, Nara, Jú Diniz, Barbara, Esther, Frodo, Xibungo, Cadu, e todos os outros que não me lembrei.

*"Muitos são os obstinados
que se empenham no caminho
que escolheram,
poucos os que se empenham
no objetivo!"*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

FRANÇOSO, R. **Óleos essenciais na alimentação de equinos**. [Essentials Oil in horses diets]. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O concentrado em substituição à parte da forragem na alimentação, principalmente por grãos de cereais ricos em amido, a fim de suprir as necessidades energéticas do animal, pode exceder a capacidade digestiva do intestino delgado e atingir o ceco e cólon, acarretando em mudanças na microbiota e causando distúrbios gastrointestinais. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação do óleo essencial carvacrol sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, resposta glicêmica e insulinêmica pós-prandial, pH fecal, perfil plasmático de triglicerídeos, colesterol total, frações de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C). Foram utilizados oito animais da raça Mini-horse, machos, castrados, com idade de 42 ± 6 meses, peso médio de 135 ± 15 kg, alimentados com dieta contendo alta proporção de concentrado: volumoso, constituída de 60% concentrado comercial peletizado e 40% de feno de gramínea, cuja variação foi a inclusão de um produto contendo 7% de carvacrol, onde os tratamentos foram inclusão de controle, 100, 200 e 300 ppm de óleo essencial contendo 7% de carvacrol. O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo 4×4 com medidas repetidas no tempo e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 5%. Os resultados dos coeficientes de digestibilidade MS, MO, PB, EE, MM, FDN e FDA foram respectivamente, $P = 0,48$; $P = 0,66$; $P = 0,58$; $P = 0,64$; $P = 0,55$; $P = 0,58$; $P = 0,46$; valores de pH fecal observados foram adequados ($\text{pH} = 6,38$) para o equilíbrio da microbiota, não sendo observado efeito de tratamento ($P = 0,84$). Na avaliação da área abaixo da curva (AAC), não foi observado efeito de tratamento ($P = 0,48$) para os valores de glicose. A resposta plasmática de insulina apresentou efeito quadrático para AAC ($P = 0,05$) nos tempos (90, 150 e 210 minutos). Na avaliação de gordura plasmática não foi encontrado efeito de tratamento para triglicérides o valor de ($P = 0,37$), para colesterol total e frações HDL, LDL e VLDL os valores foram respectivamente, $P = 0,85$; $P = 0,57$; $P = 0,94$; $P = 0,37$. A inclusão de óleo essencial na dieta não promove efeito sobre a digestibilidade, resposta glicêmica, perfil plasmático de

gordura plasmática e pH das fezes. A inclusão de óleo essencial promove efeito sobre a resposta insulinêmica.

Palavras-chave: Carvacrol, Digestibilidade., Glicose., Insulina.

ABSTRACT

FRANÇOSO, R. **Oil essentials in horses diets**. [Óleos essenciais na alimentação de equinos]. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The concentrate to replace part of the forage in the diet, mainly cereal grains rich in starch, in order to meet the energy needs of the animal, may exceed the digestive capacity of the small intestine and reach the cecum and colon, resulting in changes in the microbiota and causing gastrointestinal disorders. The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation of carvacrol as essential oil on the apparent digestibility of nutrients, glucose and insulin responses postprandial fecal pH, plasma levels of triglycerides, total cholesterol and its fractions high density lipoprotein (HDL-C), low density lipoprotein (LDL-C) very low density lipoprotein (VLDL-C). Were used eight animals, Mini-horse breed, geldings, aged 42 ± 6 months, average weight 135 ± 15 kg, fed a diet containing high relation concentrate:roughage, consisting of 60% commercial concentrate and 40 % of grass hay, which variation was the inclusion of essential oil containing 7% carvacrol, with the treatments divided according to the level of inclusion: 0 (control), 100, 200 and 300 ppm. The experimental design was 4x4 latin square with repeated measures over time and the data were subjected to analysis of variance with a significance level of 5%. The results of the digestibility coefficients of dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), ether extract (EE), mineral matter (MM), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were, respectively, $P=0.48$; $P=0.66$; $P=0.58$; $P=0.64$; $P=0.55$; $P=0.58$ and $P=0.46$. Faecal pH values were found suitable ($\text{pH}=6.38$) to the balance of microorganisms, and there was no effect of treatment ($P=0.84$). In evaluation of the area under the curve (AUC), weren't observed effects of treatment ($P=0.48$) values for glucose. The response of plasma insulin showed a quadratic effect for AUC ($P=0.05$) in times 90, 150 and 210 minutes. In the evaluation of plasma lipids wasn't found effect treatment of the triglyceride value ($P=0.37$) for total cholesterol, and HDL-C, LDL-C and VLDL-C values were respectively ($P=0.85$; $P=0.57$; $P=0.94$ and $P=0.37$). The inclusion of essential oil in the diet does not promote effect on digestibility, glycemic response, plasma levels lipids and plasma pH of feces. The inclusion of essential oils promotes effect on the insulin response.

Keywords: Carcavrol., Digestibility., Glucose., Insulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural de alguns óleos essenciais	37
Figura 2 -	Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana	39
Figura 3 -	Mecanismo de ação do carvacrol	41
Figura 4 -	Média dos coeficientes de digestibilidade aparente da MS e MO, em função dos tratamentos experimentais, 0,100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais	53
Figura 5 -	Média dos coeficientes de digestibilidade aparente do FDN e FDA, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200, e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais	55
Figura 6 -	Média dos coeficientes de digestibilidade aparente da PB, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais	57
Figura 7 -	Média dos coeficientes de digestibilidade aparente do extrato etéreo, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200, 300 ppm de inclusão de óleos essenciais	59
Figura 8 -	Curva das médias para concentração plasmática de glicose (mg/dL) em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial, em função do tempo (minutos)	64
Figura 9 -	Curva das médias para concentração plasmática de insulina (μ U/ml) em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial, em função do tempo (minutos)	66
Figura 10 -	Média dos valores de concentração plasmática de triglicerídeos (mg/dL), para os tratamentos 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial	70
Figura 11 -	Média dos valores de concentração plasmática de colesterol total, HDL-C, LDL-C e VLDL-C (mg/dL), para os tratamentos 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva das médias dos valores de pH fecal em função do tempo e dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial	61
Gráfico 2 -	Área abaixo da curva para a concentração de insulina calculada e observada, para os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica do concentrado utilizado nas dietas experimentais	45
Tabela 2 - Composição bromatológica dos feno de tifton 85 das dietas experimentais	45
Tabela 3 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os coeficientes de digestibilidade aparente dos constituintes da dieta de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial.....	51
Tabela 4 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os valores de pH fecal, de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial.....	60
Tabela 5 - Médias e desvio padrão (DP) para as concentrações plasmáticas de glicose de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial em função do tempo (minutos).....	62
Tabela 6 - Médias e erro padrão da média (EPM) para área abaixo da curva (AAC) nas concentrações plasmáticas de glicose de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial.....	63
Tabela 7 - Médias e desvio padrão (DP) para as concentrações plasmáticas de insulina de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial em função do tempo (minutos).....	65
Tabela 8 - Médias e erro padrão da média (EPM) para área abaixo da curva (AAC) nas concentrações plasmáticas de insulina de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial.....	67
Tabela 9 - Médias e erro padrão da média (EPM) para as concentrações plasmáticas de triglicerídeos de acordo com os tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial	69
Tabela 10 - Médias e erro padrão da média (EPM) para as concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-C, LDL-C e VLDL-C de acordo aos tratamentos	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

AAC	Área abaixo da curva
AC	Alta relação concentrado:volumoso
AGV	Ácido graxo volátil
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Baixa relação concentrado:volumoso
Ca	Cálcio
CD	Coeficiente de digestibilidade
EE	Extrato etéreo
F1	Faixa 1
F2	Faixa 2
F3	Faixa 3
F4	Faixa 4
FDA	Fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	Fibra insolúvel em detergente neutro
g	Gramas
h	Horas
HDL-C	Fração colesterol ligado á lipoproteína de alta densidade
LDL-C	Fração colesterol ligado á lipoproteína de baixa densidade
Kg	Quilos
µU/ml	Micro unidades por mililitro
Min	Minutos
mg/dL	Miligramas por decilitro
ml	Mililitro
Na ⁺	Sódio
L	Litro
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria Seca
OES	Óleos essenciais
P	Fósforo

PB	Proteína bruta
pH	Potencial hidrogênico
PPM	Partículas por milhão
PV	Peso vivo
VLDL-C	Fração colesterol ligado á liproteína de muito baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
dL	Decilitro
g	Gramas
h	Hora
Kg	Quilograma
m	Metro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
$\pm$	mais ou menos
<	Menor
μ	Micro
s	Segundos
%	Porcentagem
=	Igual
-	Menos
$^{\circ}$ C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	Sistema digestório dos equinos	24
3.2	Aspectos da nutrição equina	27
3.3	Digestibilidade dos nutrientes	28
4	ÓLEOS ESSENCIAIS	33
4.1	Caracterização dos óleos essenciais	37
4.2	Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais	38
5	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1	Local	44
5.2	Animais	44
5.3	Dietas e procedimento experimental	44
5.4	Metodologia de coletas e processamento das amostras	46
5.4.1	Digestibilidade aparente total	46
5.4.2	Glicose e insulina	47
5.4.3	pH fecal	47
5.4.4	Gordura plasmática	47
5.5	Análises laboratoriais	48
5.6	Delineamento experimental	48
5.7	Análises estatísticas	49
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1	Digestibilidade aparente	50
6.1.1	Digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica	52
6.1.2	Digestibilidade aparente do FDN e FDA	54
6.1.3	Digestibilidade aparente da proteína bruta	56
6.1.4	Digestibilidade aparente do extrato etéreo	58
6.2	pH fecal	60
6.3	Glicose	62
6.4	Insulina	65
6.5	Triglicérides	69
6.6	Colesterol total e frações ligadas a lipoproteína	71

7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

É conhecido que a criação dos animais de produção está baseada no tripé nutrição-genética-sanidade, onde a alimentação e saúde são essenciais para a expressão de sua genética (GONZAGA, et al., 2010).

Os equinos são animais herbívoros não ruminantes, que possuem estômago simples e intestino grosso altamente desenvolvido, com câmara de fermentação comparada ao rúmen de bovinos, que possibilita utilização dos carboidratos estruturais presente nos alimentos volumosos para obtenção de energia, sendo os carboidratos não estruturais as fontes primárias de energia. As pastagens de boa qualidade são capazes de atender as exigências nutricionais de equinos em manutenção, mas não suprirem as exigências energéticas de equinos de alto desempenho, sendo necessário o uso de suplementos, como grãos de cereais. Estes suplementos contêm grandes quantidades de açúcares e amido, fornecendo mais energia que as forragens. No entanto, a variação sazonal das pastagens deve ser considerada na determinação da contribuição nutricional do pasto na alimentação dos equinos. Em geral, as pastagens jovens, em estágio de crescimento, possuem maiores teores de energia, carboidratos não estruturais e proteínas e, quando suplementada com concentrados, pode ocorrer sobrecarga de carboidratos não estruturais, aumentando os riscos de desordens digestivas, como cólicas.

Os carboidratos são extremamente importantes na dieta dos equinos, sendo os carboidratos não estruturais as fontes primárias de energia. Os monossacarídeos são as únicas formas de carboidratos que podem ser absorvidos pelo intestino delgado e os carboidratos mais complexos são fermentados no intestino grosso, onde ocorre a fermentação microbiana. Os carboidratos na dieta de equinos, constituem cerca de 75% da ração, no entanto, é necessário que haja um equilíbrio entre carboidratos estruturais e não estruturais, pois a ingestão de quantidades elevadas de amido podem não ser totalmente digerida no intestino delgado, chegando ao ceco e cólon, promovendo o desequilíbrio da microbiota intestinal (BRAGA, 2006). Essa mudança na microbiota pode ter como consequência o aumento da produção de ácido lático e queda do pH, podendo causar distúrbios gastrointestinais, podendo ocasionando diversas enfermidades aos cavalos. Atualmente, algumas pesquisas estão sendo conduzidas para demonstrarem a importância do equilíbrio na microbiota intestinal, através de uma alimentação adequada, favorecendo o crescimento de uma biota benéfica, para melhor aproveitamento alimentar e desenvolvimento do animal.

Os agentes antimicrobianos são utilizados tanto no tratamento das infecções bem como aplicados às rações dos animais para preveni-los e melhorar seu desempenho alimentar. Tais agentes, em concentrações subclínicas, são chamados de promotores de crescimento, pois atuam no controle profilático pela destruição dos patógenos além de inibirem microrganismos competidores e produtores de vitaminas (BARCELOS; SOBESTIANSKY, 1998).

A maior parte da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias e ervas aromáticas parece estar associada com compostos fenólicos (DAVIDSON; NAIDU, 2000). O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Origanum vulgare, pertencente à família *Lamiaceae*, é originária dos países mediterrâneos, também conhecida como manjerona brava. As propriedades medicinais são expectorantes, antioxidante, diurética, antiséptica, calmante e tônico digestivo. Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol (CÁCERES, 1999).

Os Óleos Essenciais (OES), derivados de plantas utilizadas como condimentos, representam complexas misturas de substâncias naturais, tradicionalmente utilizadas para acentuar gosto ou aroma de alguns alimentos. Constituem-se de substâncias, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, em que um composto farmacologicamente ativo, é majoritário. A maior parte da atividade antimicrobiana de OES parece estar associada aos compostos fenólicos. O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

A atividade bioquímica das bactérias entéricas produz um amplo leque de substâncias, muita das quais são extremamente tóxicas, requerendo, por parte do hospedeiro, uma constante desintoxicação. A neutralização adequada dessas substâncias exige um contínuo gasto de energia procedente da dieta. A eficiência desta neutralização, contudo, está relacionada à qualidade da ração, aos aditivos, principalmente aos antimicrobianos ou aos probióticos utilizados, e à sanidade e ao manejo dispensado ao plantel (SILVA et al., 2007).

Estima-se que 90% da área do intestino de um animal adulto seja habitada por mais de 400 espécies diferentes de microrganismos, o que representa 10 vezes mais bactérias no trato digestivo do que células no corpo do hospedeiro. Para auxiliar nessa fase, podem ser utilizados antimicrobianos promotores do crescimento, responsáveis por promover alterações na composição da microbiota intestinal. Entre essas alterações, incluem-se a perda da

eficiência de fixação de certos microrganismos ao epitélio intestinal e o controle de bactérias causadoras de doenças não diagnosticáveis que reduzem o crescimento do animal (MENTEN, 2002).

Pesquisas são conduzidas em várias instituições para avaliar o potencial de componentes secundários de plantas como agentes naturais para manipular a fermentação do rúmen. Plantas produzem vários compostos secundários, para se protegerem de insetos, animais, fungos ou bactérias. Estes compostos secundários são diversos em estrutura, entre eles, os mais investigados são taninos, saponinas e leveduras. Esses são usados como manipuladores da fermentação ruminal, podendo ser benéficos ou prejudiciais para o ruminante, dependendo da concentração e estrutura dos mesmos. Dessa maneira, propõe-se experimentar e analisar os efeitos em equinos.

2 OBJETIVOS

Investigar o efeito da inclusão de diferentes níveis do óleo essencial carvacrol na dieta de equinos, sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, sobre a resposta glicêmica e insulinêmica pós-prandial, no perfil plasmático de gordura plasmática (colesterol e suas frações e triglicérides), e o efeito sobre o pH das fezes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistema digestório dos equinos

O trato gastrointestinal dos equinos apresenta características anatômicas e fisiológicas peculiares em relação ao de outras espécies domésticas, sendo classificado como herbívoro monogástrico, apresentando, entretanto, fenômenos de digestão no ceco e cólon maior, semelhante aos poligástricos. Cada segmento desempenha funções específicas na digestão e absorção dos nutrientes, com destaque para os intestinos delgado e grosso nesse processo. A apreensão dos alimentos nos equinos efetua-se com o auxílio dos lábios, língua e dentes, sendo necessária para a mastigação uma dentição completa e sem anomalias. Devido à grande mobilidade dos lábios, os equinos podem selecionar os alimentos mais palatáveis. A duração da mastigação depende da natureza do alimento, ou seja, demorando cerca de 10 minutos para mastigar 1 kg de aveia ou ração peletizada, enquanto demoram 40 minutos para mastigar 1 kg de feno (THOMASSIAN, 2005; MEYER, 1995).

O processo da mastigação libera uma grande quantidade de saliva, que contém amilases e enzimas envolvidas na quebra de carboidratos (CUNHA, 1991), nos quais, os alimentos além de serem moídos, liberam substâncias como proteínas e açúcares, que podem ser posteriormente digeridos no estômago e no intestino delgado. A mastigação é acompanhada por uma produção abundante de saliva (40-90ml/min) que possibilita a deglutição, umedecendo o alimento com quantidades de minerais e bicarbonato que servem para neutralizar os ácidos formados na porção inicial do estômago, porém a saliva contém uma concentração muito baixa de amilase (MEYER, 1995).

Lewis (2000) descreve que no estômago, ocorre uma parte da digestão protéica e degradação parcial dos alimentos, com capacidade de 15 a 18 litros, ajustado para uma recepção contínua de pequenas quantidades de alimento, o estômago se preenche em camadas, na região do saco cego aglandular e na região glandular fúndica, sendo posteriormente conduzido ao terço final onde será liquefeito, os processos digestivos no estômago são concretizados por uma atividade das enzimas alimentares, microorganismos e suco gástrico (THOMASSIAN, 2005; MEYER, 1995).

E de acordo Cunha (2001), o tempo de passagem do alimento do estômago para o intestino delgado é rápida; ou seja, a degradação de amido e açúcares é restringida pelo

reduzido tempo de ação de microorganismo, além do desfavorecimento das bactérias pelo baixo pH.

No intestino delgado é digerida boa parte das gorduras, proteínas e carboidratos solúveis, este sendo subdividido respectivamente em duodeno, jejuno e íleo, e o intestino grosso que contém microorganismos que digerem boa parte das fibras, é subdividido respectivamente em ceco, cólon ventral direito, a flexura externa para cólon ventral esquerdo, a flexura pélvica para cólon dorsal esquerdo, a flexura diafragmática para cólon dorsal direito, cólon menor e o reto (THOMASSIAN, 2005; MEYER, 1995).

A fase cefálica que é mediada pelo nervo vago em razão do olfato e paladar, a fase gástrica propriamente dita, que é caracterizada pela distensão do estômago e processos químicos, e a fase entérica que inicia com a passagem do alimento ao intestino delgado. A motilidade gastroentérica é classificada em dois tipos: Movimento segmentar que é o que proporciona a homogeneização da digesta, movimento propulsivo ou progressivo que se encarrega de transportar os alimentos aos diversos segmentos aborais (THOMASSIAN, 2005; MEYER, 1995).

O tempo de permanência do alimento nos diversos segmentos do trato gastrointestinal depende de múltiplos fatores, tais como individualidade, grânulometria das partículas, digestibilidade, pureza dos alimentos, frequência da alimentação, tipo de exercício, ingredientes da dieta, temperatura ambiente e o teor de fibra da ração (MEYER, 1995).

Wolter (1977) cita que a parede do intestino delgado é muito musculosa, rígida e ricamente enervada, gerando fortes ondas de contração, assim a progressão da digesta é resultante do sinergismo das secreções salivares, gástrica, pancreática, biliar e entérica.

A mucosa duodenal possui glândulas que secretam suco entérico e grande quantidade de muco, suas inúmeras vilosidades revestidas de células epiteliais cilíndricas com microvilosidades aumentam a superfície de absorção dos alimentos (MEYER, 1995).

Segundo Lewis (2000) a maioria das vitaminas e minerais também são absorvidas no intestino delgado e os líquidos passam rapidamente por este órgão e alcançam o ceco de 2 a 8 horas após a ingestão.

Thomassian (2005) relata que a motilidade do intestino delgado, conseqüentemente da digesta, se faz principalmente por controle neural e é regulada por marca-passos que desencadeiam a atividade mioelétrica segmentar e propulsiva denominada de Complexo de Migração Mioelétrica, sendo este fenômeno dependente de íons cálcio. Esse mecanismo é influenciado pelo grau de repleção da alça, grau de digestão dos alimentos, e se o animal está ou não submetido a jejum ou alimentando-se regularmente.

O intestino delgado do equino divide-se em duodeno, jejuno e íleo, mede cerca de 20 metros em um animal adulto de porte médio, representando segundo Cunha (2001), 30% do trato digestório. Neste compartimento, através de mudanças de tônus e contrações rítmicas, o conteúdo intestinal é misturado e sofre ação das enzimas pancreáticas, proteases, amilase e lipases, recebe bile continuamente por não possuir vesícula biliar, e também é observada uma quantidade considerável de microorganismos anaeróbicos, sendo o principal local de digestão e absorção de carboidratos solúveis, além de gorduras e proteínas Meyer (1995).

A primeira porção do intestino grosso é o ceco que é responsável principalmente pela fermentação da fibra, notadamente através da microbiota composta de protozoários e bactérias. O ceco possui a capacidade de absorver cerca de 2/3 da água e dos eletrólitos provenientes do intestino delgado.

O intestino grosso do cavalo compreende seções volumosas, bem articuladas e compartimentalizadas. A atividade do ceco e do cólon depende principalmente do tipo e da quantidade de substâncias nutritivas provenientes do intestino delgado, da velocidade de trânsito da ingesta e da capacidade de tamponamento do lúmen.

Este compartimento é o local primário de digestão dos carboidratos estruturais, que são digeridos por enzimas produzidas pelo microorganismos presentes e absorvidos na forma de ácidos graxos voláteis, como acetato, propionato e butirato (HINTZ et al., 1971a), além de vitaminas e aminoácidos.

Koller (1978) utilizando pôneis fistulados no ceco e bovinos fistulados no rúmen, concluiu que as bactérias do rúmen digerem matéria seca e parede celular vegetal mais eficientemente do que as bactérias cecais, mesmo quando expostas às semelhantes intervalos de tempo.

A fisiologia do cólon maior e do cólon menor compreendem basicamente os mesmos fenômenos que ocorrem na digestão e absorção de alimentos no ceco. As porções finais do cólon maior atuam como mecanismos de regulação das secreções e absorção deste segmento intestinal, mantendo, entretanto, um grau de umectação que possibilita o transporte da digesta em direção ao cólon menor. O cólon menor tem por função absorver parte do conteúdo líquido da digesta, dar forma ao bolo fecal e recobri-lo com película de muco para evitar lesões na mucosa e facilitar a progressão e conseqüentemente defecação (THOMASSIAN, 2005).

3.2 Aspectos da nutrição equina

Com o crescimento da equideocultura, a nutrição equina obteve um grande espectro na produção, uma vez que, através da alimentação adequada, o animal conseguirá alcançar o seu potencial de desenvolvimento, de acordo sua finalidade, raça, idade, etc. Para tanto, nessa área deve-se conhecer o valor nutricional dos alimentos, suas limitações, os nutrientes requeridos pelo equino e a técnica para combinar essas informações em uma dieta balanceada, a fim de atender as exigências nutricionais durante os vários períodos da vida do animal (CUNHA, 1991).

O consumo de alimentos pelos equinos adultos pode variar entre 1,5% a 2,5% do peso vivo (PV) em matéria seca (MS), podendo chegar a 3% do PV no caso de animais em lactação ou em crescimento, sendo essa porcentagem associada à quantidade de fibra bruta na dieta (ANDRIGUETTO et al., 1984).

A energia na nutrição equina é o fator de maior importância, principalmente para os cavalos em atividade, sendo fornecidas através da forragem e mistura de forragem com concentrado. A necessidade proteica, vitamínica, mineral, dependem da forragem recebida e na fase de vida que se encontram (ANDRIGUETTO et al., 1984).

A forragem, ou volumoso, sempre foi a base da alimentação do cavalo, por conter grandes quantidades de fibra bruta na composição. Mas hoje em dia a tendência é reduzir ao máximo a utilização deste tipo de material, devido à dificuldade de conseguir volumoso de qualidade homogênea, da necessidade de espaço de armazenamento, pelo manuseio trabalhoso ou de carga de pó durante a alimentação (MEYER, 1995), além de apenas o seu fornecimento não suprir as exigências energéticas necessárias pela atividade, devido a baixa digestibilidade dos carboidratos da parede celular da forragem (JOUANY et al., 2008).

Como consequência, os concentrados, em sua maioria grãos de cereais, foram incluídos na dieta, substituindo parte do fornecimento de forragem, chegando a níveis de inclusão de até 80%. Segundo Lewis (1985), os concentrados são alimentos que fornecem uma alta concentração de energia alimentar, possuindo uma baixa quantidade de fibra bruta.

Porém, o equilíbrio entre esses dois tipos de fonte energética deveria ser levada em consideração, pois o cavalo como herbívoro necessita ingerir fibras para manter o equilíbrio da microbiota intestinal, a fim de evitar distúrbios gastrointestinais, sendo recomendado em alimentações com concentrados o fornecimento regular dividido em, pelo menos, três refeições ao dia, além de uma boa fonte de volumoso de boa qualidade. A ingestão de fibra

bruta na dieta deveria obedecer a um teor de 16 a 18% (ANDRIGUETTO et al., 1984; MEYER, 1995).

Além do mais, a necessidade energética deve levar em consideração alguns parâmetros como: tipo de trabalho, tempo de duração, temperatura do ambiente, condição do animal, entre outros. O conhecimento das práticas nutricionais é essencial para coordenar um bom programa alimentar ao animal, contudo, é necessário conhecer juntamente com as atividades e características específicas de cada animal, o funcionamento da fisiologia digestiva dos equinos, para adequar as suas necessidades e maximizar o aproveitamento dos nutrientes fornecidos.

3.3 Digestibilidade dos nutrientes

Digestível é considerada a parte do alimento que não é eliminada com as fezes, correspondendo, não totalmente, à porção do alimento que ganha o meio interno através da parede do trato digestivo (MEYER, 1995).

Com relação às fontes de carboidratos utilizados nos concentrados, os equinos quando selvagens, não possuíam o hábito de ingerir grãos ou mesmo outras fontes de amido. Com a domesticação e o uso de animais em eventos esportivos, os carboidratos passaram a ser utilizados como a principal fonte para atender as exigências energéticas (RADICKE et al., 1991).

Devido ao fato de que a digestão e absorção de carboidratos solúveis e de proteína ocorrem antes do intestino grosso, pouco material, além do material fibroso, atinge o ceco dos equinos, podendo prejudicar a população de microorganismos, diminuindo assim o aproveitamento dos carboidratos estruturais (UDEN; VAN SOEST, 1982).

Os carboidratos são formados por moléculas de carbono, hidrogênio e oxigênio. São avaliados nas dietas, em função das características anatômicas dos vegetais, com ênfase na parede celular vegetal e do conteúdo celular (VAN SOEST, 1994). Podem ser classificados em estruturais e não estruturais. Os estruturais são constituídos por polissacarídeos, presentes na parede celular, como hemicelulose e celulose, juntamente com lignina. Os não estruturais são formados por carboidratos simples, como o amido, monossacarídeos, dissacarídeos, frutanos, pectinas e outros.

Segundo Hoffman et al., (2001) a classificação dos carboidratos podem ser divididas em três frações: (1) em carboidratos-hidrolisáveis, o qual inclui monossacarídeos, dissacarídeos e amidos, que serão hidrolisados à açúcares simples no intestino delgado; em carboidratos fermentáveis no intestino grosso, que irão produzir ácidos graxos voláteis, subdivididos em uma fração; (2) em rapidamente fermentáveis, que incluem oligossacarídeos, frutanos, galactanos, B-glucanos e substâncias pécticas; e uma fração (3) lentamente fermentável, que incluem fibras em detergente neutro, como a hemicelulose e celulose.

Esse sistema proposto por Hoffman et al. (2001), pode avaliar melhor o valor da energia da porção dos carboidratos da alimentação, como componentes separados que são absorvidos como glicose, daqueles que são fermentados como ácidos graxos voláteis (AGV).

A digestão do amido pode ser influenciada por fatores intrínsecos, como a forma física do alimento, granulação, recristalização, complexos amilose-lipídeo, inibidores nativos da alfa-amilase e por fatores extrínsecos: mastigação, tempo de trânsito, concentração de alfa-amilase no intestino, quantidade de amido ingerida e a presença de outros constituintes alimentares que podem retardar a hidrólise enzimática. Os autores ressaltam também a existência de uma porção indigerível, resistente à ação da alfa-amilase, a qual escapa a digestão pré-cecal (ENGLYST et al., 1987).

Segundo relatos de Van Soest (1994), devido a digestão e absorção de carboidratos não-estruturais e da proteína ocorrerem antes do intestino grosso, pouco substrato além de material fibroso atinge o ceco do equino, podendo prejudicar a população de microorganismos, uma vez que necessitam de carboidratos, proteínas e minerais para metabolizarem os carboidratos estruturais.

Segundo Gray (1992), a estrutura do amido (amilose+amilopectina) é clivada na cavidade duodenal pela enzima alfa-amilase secretada pelo pâncreas. Desse modo, originam-se dissacarídeos, trissacarídeos e alfa-dextrinas, que posteriormente sofrem hidrólise pela ação complementar de três enzimas presentes na borda em escova da superfície intestinal. O monossacarídeo gerado como produto final, a glicose, é então co-transportado para o interior dos enterócitos com o auxílio do sódio (Na^+), por uma proteína transportadora específica (75-KDA) presente na superfície da borda em escova, em uma taxa limitante de assimilação do amido. Devido a esta digestão sequencial luminal e membranosa, seguido pelo transporte de glicose, o amido é assimilado de maneira muito eficiente em animais não ruminantes.

Apesar da digestibilidade total do amido ser alta, podendo variar de 87 a 100%, os equinos possuem baixa atividade da enzima alfa-amilase pancreática, o que pode

comprometer a digestibilidade pré-cecal de dietas com altas quantidades ou fontes morfológicamente complexas deste nutriente (KIENZLE et al., 1994).

A produção de ácidos graxos voláteis no intestino grosso dos equinos pode suprir em grande parte a necessidade energética de manutenção através do consumo de forragens. Porém, para atingir a necessidade energética de cavalos em atividade, se torna insuficiente, sendo suprida tradicionalmente pela adição de grãos e/ou subprodutos de grãos de cereais, que possuem grandes quantidades de amido que fornecem mais energia do que as forragens (NRC, 2007).

Segundo Hoffman et al., (2001), carboidratos hidrolisáveis e de rápida fermentação são encontrados em grandes quantidades em grãos de cereais e gramíneas jovens e uma ingestão excessiva de carboidratos hidrolisáveis pode ocorrer quando a pastagem em crescimento é suplementada com concentrado, mostrando que essa associação pode acarretar em desordens digestivas e metabólicas.

A concentração de ácidos graxos voláteis é determinada no ceco e não no cólon, de acordo com a proporção entre concentrado e volumoso. O excesso de carboidratos hidrolisáveis e de rápida fermentação atingem o ceco, pode levar ao desenvolvimento excessivo dessa microbiota, causando uma queda na produção de acetato, na redução do pH e aumentando a proporção de ácido propiônico e láctico (MEYER, 1995).

Medina et al. (2002) em seus estudos, relataram o aumento da concentração total de bactérias anaeróbicas, da utilização de ácido láctico pelas bactérias, *lactobacillus* spp e *streptococcus* spp, e diminuição no número de bactérias celulolíticas no ceco. Constaram uma redução na concentração de acetato, enquanto houve aumento da concentração de propionato e queda do pH no ceco e cólon, quando os cavalos foram alimentados com dieta de alta concentração de amido.

Outros estudos foram conduzidos a fim de avaliar o impacto da inclusão de concentrados na dieta. Julliand et al. (2001), avaliando o efeito da inclusão de três diferentes proporções de volumoso:concentrado (100:0, 70:30 e 50:50) na atividade microbiana, constatou que o aumento gradativo da cevada à dietas, reduziu o pH do ceco e cólon, com diferenças significativas, principalmente entre os tratamentos 100:0 e 50:50, devido ao aumento do lactato decorrente do aumento de bactérias amilolíticas (*lactobacillus* e *streptococcus*) por uma possível elevação da quantidade de amido no ceco e cólon, além da queda na concentração de bactérias celulolíticas.

Esse trabalho, em complementação a mais dois estudos conduzidos por Drogoul et al.,(2001), mostram que o aumento na elevação dos níveis de concentrado na dieta aumenta a

passagem destes do intestino delgado para o ceco, resultando em maior quantidade de carboidratos não estruturais no intestino grosso e consequentemente mudanças na microbiota.

A fibra não é uma substância química específica, é constituída por carboidratos, especialmente celulose e hemicelulose que juntamente com a lignina, formam a parede celular dos vegetais que não pode ser digerida pelas enzimas digestivas, porém, é susceptível a degradação em intensidade variável pelos microrganismos intestinais.

A eficiência de utilização da fibra dietética pelos equinos é associada a importantes fatores como a composição da dieta, especialmente a proporção entre volumoso e concentrado, a taxa de fermentação microbiana e a taxa de passagem da digesta pelo trato digestório, sendo que o aumento da digestibilidade da fibra geralmente está associado ao aumento do tempo de retenção da digesta (DROGOUL et al., 2001).

Nos animais não ruminantes a estratégia de utilização digestiva dos componentes da parede celular vegetal varia consideravelmente de acordo com as particularidades morfofisiológicas do trato digestório de cada espécie animal, com destaque para os equinos, por apresentarem a maior capacidade de digestão da fração fibrosa (SLADE; HINTZ, 1969).

A fibra pode ser classificada, quanto à sua solubilidade, em fibra solúvel e fibra insolúvel, exercendo vários efeitos metabólicos e fisiológicos no organismo animal que podem ser decorrentes de alterações na função fisiológica como a taxa de excreção endógena e a taxa passagem de alimento no trato gastrointestinal, alterações no bolo alimentar e na digesta como capacidade de retenção de água, volume, pH e fermentação (VAN SOEST, 1994), ou ainda, por alterações nas atividades dos microrganismos intestinais.

A fibra solúvel é composta por polissacarídeos não amiláceos e não recuperados na fibra em detergente neutro como as substâncias pécicas, gomas, frutanas, oligossacarídeos e β -glucanos, enquanto a fração insolúvel é composta por celulose, lignina e a maioria das hemiceluloses (GUERRA et al., 2004).

HINTZ et al. (1971b) salientaram que os cavalos digerem fibras com 60 a 70% da eficiência da digestão dos ruminantes. A menor digestão ocorre pelo fato dos equinos apresentarem a taxa de passagem da digesta mais rápida, reduzindo, desta forma, a exposição do alimento à ação microbiana no intestino grosso (ÚDEN; VAN SOEST, 1982). O intestino grosso dos equinos é muito desenvolvido, e seu volume representa 60 % do volume total do trato digestório, dividindo-se em ceco, cólon e reto.

A forma anatômica e a motilidade do ceco e do cólon dos equinos favorece o maior tempo de retenção do alimento em relação aos outros compartimentos do trato gastrointestinal,

o que possibilita a ação dos microrganismos na digestão dos constituintes da parede celular das forragens.

Segundo Drogoul et al. (2000) existem dois fenômenos de retenção seletiva no intestino grosso de equinos, um ocorre no ceco e cólon ventral com retenção de partículas grosseiras ocasionadas pelas contrações retropulsivas originárias na área da flexura pélvica do cólon maior e na junção do cólon ventral e dorsal (ARGENZIO et al., 1974) sendo esta a maior barreira para o fluxo de partículas grandes, maiores que 1cm (DROGOUL et al., 2000). O outro fenômeno está relacionado a algum mecanismo na transição do cólon dorsal e distal, que, preferencialmente, retém líquido e partículas pequenas menor que 2 mm, comparada a partículas maiores.

Este mecanismo ocorre porque as contrações musculares da parede do cólon distal impulsionam o líquido em movimento retroprogressivo em direção ao cólon dorsal direito resultando em retenção seletiva, não de partículas grosseiras como no grande cólon ventral, mas de líquido e partículas finas (HUME; SAKAGUSHI, 1991).

Quando os carboidratos não estruturais como amido, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e frutanas são consumidos em grandes quantidades escapam à hidrólise no intestino delgado e passam para o intestino grosso onde irão fermentar rapidamente produzindo excesso de gases e ácido láctico. A alta concentração de ácido láctico retém água e reduz o pH luminal para valores inferiores a seis, aumentando o risco de desordens digestivas como diarreia osmótica e cólica associadas à distensão intestinal por gases e fluidos (COHEN et al., 1999).

A produção de AGV no intestino grosso dos equinos pode suprir em grande parte a necessidade energética de manutenção através do consumo de forragens. Porém, para atingir a necessidade energética para equinos em atividade torna-se insuficiente, sendo suprida, tradicionalmente, pela adição de grãos e/ou subprodutos de grãos de cereais que possuem grandes quantidades de amido fornecendo mais energia do que as forragens (NRC, 2007).

4 ÓLEOS ESSENCIAIS

A utilização de extratos vegetais e plantas medicinais pelo homem data de milhares de anos, sendo muito difundida no Egito Antigo, na China, na Índia e na Grécia. Os principais efeitos exercidos pelas plantas podem ser explicados pela presença e constituição de seu(s) princípio(s) ativo(s). Na formulação das rações, recomenda-se a utilização de uma combinação de diferentes extratos herbais, reforçados com seus princípios ativos, para atingir resultados técnicos satisfatórios (BRUGALLI, 2003).

De acordo com a Resolução CNNPA, nº 12, de 1978, condimentos ou temperos são produtos constituídos de uma ou diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregados nos alimentos com o objetivo de modificar ou exaltar o seu sabor (Resolução CNNPA nº12 de 1978). Óleos essenciais, conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas (BRASIL, 1978).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes preponderantes (SIMÕES et al., 1999).

Por várias décadas, os antimicrobianos promotores de crescimento foram utilizados em dietas para suínos recém-desmamados e em crescimento, no intuito de diminuir a incidência de diarreia pós-desmame e promover melhora no desempenho animal (HERMANDÉZ; MADRID; GARCIA, 2004). Na década de 90 o uso desses aditivos passou a ser visto como fator de risco para a saúde humana, principalmente em decorrência de duas contestações a presença de resíduos dos antimicrobianos na carne, nos ovos e no leite e a indução de resistência cruzada para bactérias patogênicas para humanos (MENTEN, 2001).

Com isso, surgiram restrições quanto ao uso de antibióticos e quimioterápicos na alimentação animal. Este fato estimulou pesquisas de compostos que tivessem uma ação semelhante à dos antibióticos promotores de crescimento e que não interferissem negativamente no desempenho do animal (UTIYAMA; OETTING; GIANI, 2006).

Os óleos essenciais têm como principais constituintes o carvacrol e o timol, e agem contra os micro-organismos através de uma ação lipofílica na membrana celular, dispersando as cadeias de polipeptídeos que irão constituir a matriz da membrana celular (NOSTRO, 2004).

Os suplementos dietéticos para utilização em equinos estão amplamente disponíveis, o uso é particularmente atraente para proprietários que desejam manter os animais em melhor condicionamento para o exercício que lhe destinar ou manutenção da saúde e tratamentos de afecções específicas. Estes suplementos são classificados como “Nutracêuticos” pela Food and Drug Administration, o termo é uma união das palavras “nutrição” e “farmacêutica” podendo ser considerados como suplementos dietéticos com objetivo de tratar ou prevenir doenças, geralmente em forma concentrada destinados a ingestão oral (JONES., 1997).

Os óleos essenciais são uma mistura de terpenóides aromáticos, líquidos e lipofílicos (KOHLEERT; VAN RENSEN; MARZ, 2000) obtidos a partir de diferentes partes da planta, tais como folhas, raízes, caule ou demais partes, sendo que a melhor tecnologia para extração destes óleos essenciais é por destilação a vapor, quando comparadas pela extração com metanol ou hidroxi-acetona (BURT, 2004).

Destilação a vapor é o método comumente usado para produção de óleo essencial em escala comercial, a extração ocorre por meio de dióxido de carbono líquido sob baixa temperatura e alta pressão produzindo um perfil organoléptico de alta qualidade. Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes, é provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas existem vários alvos na célula. Uma característica importante é a hidrofobicidade, permitindo a partição dos lipídios na membrana celular bacteriana e mitocôndrias, desestabilizando as estruturas celulares (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994).

Os óleos essenciais derivados de plantas que são constituídas de diversos componentes com propriedades e funções orgânicas desenvolvem atividades antimicrobianas (BURT, 2004), antifúngicas (RASOOLI; ABYANEH, 2004; VELLUTI; SANCHIS; RAMOS, 2003), antioxidantes, e de proteção celular, principalmente em glóbulos vermelhos e glóbulos brancos (ASGARY et al., 2003; LIMA et al., 2004).

Vários são os óleos essenciais com potencial de comercialização, tais como o timol (extraído do tomilho – *Thymus vulgaris*), carvacrol (extraído do orégano – *Origanum sativum*), alina e alicina (extraídos do alho – *Allium sativum*), citrol e citronolol (extraídos de diversas plantas cítricas), menthol (extraído da menta – *Mentha piperita*) e cinamaldeído (extraído da canela – *Cinnamomum zeylanicum*) já possuem sua funcionalidade conhecida, além dos métodos de extração serem de fácil operação (VELLUTI; SANCHIS; RAMOS, 2003).

O gênero *Origanum* é caracterizado, muitas vezes, pela existência de diferentes produtos químicos, os fenóis de seus óleos essenciais variam em até 95% mesmo entre as

plantas de mesma espécie. A preponderância de carvacrol ou timol nos óleos essenciais é responsável pela sua classificação comercial como orégano ou óleo de tomilho, respectivamente. Os extratos carvacrol e timol, que constituem cerca de 78-82% do óleo total, apresentam considerável atividade antimicrobiana e antifúngica. A atividade de outros constituintes principais como os dois hidrocarbonetos monoterpênicos, *g*-Terpinene e *p*-cymene, muitas vezes contribuem para cerca de 5% e 7% do óleo total (SIVROPOULOU et al., 1996).

Timol e carvacrol possuem atividade antioxidante *in vitro*, sendo demonstrado em aves com suplementação de orégano na dieta, mas isso não tem sido associado com qualquer efeito sobre o desempenho das aves. Segundo Sivropoulou et al. (1996) o timol foi mais ativo do que o carvacrol contra bactérias Gram-negativas.

A maioria dos estudos corrobora que os óleos essenciais são ligeiramente mais ativos contra bactérias Gram-positivas (SHELEF, 1983; HARPAZ et al., 2003). As bactérias gram-negativas são menos susceptíveis à ação de antibióticos, pois possuem uma membrana externa que envolve a parede celular restringindo a difusão de compostos hidrofóbicos através da sua camada de lipopolissacarídeo (VAARA, 1992). Entretanto, nem todos os estudos concluíram que Gram-positivos são mais susceptíveis (WILKINSON et al., 2003).

Vários estudos têm relatado efeitos sobre microflora intestinal com inclusão de óleos essenciais nas dietas de frangos de corte. A suplementação dietética com capsaicina, carvacrol e cinamaldeído, reduziu o número de *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* no conteúdo retal em frangos de corte, enquanto o número de *Lactobacillus* spp obteve aumento.

Inibição seletiva no crescimento de *Clostridium sticklandii* e *Anaerobius Peptostreptococcus* foram observados com utilização de terpenos na dieta de ruminantes contendo timol, eugenol, vanilina e limoneno. Os terpenos se ligam a componentes da dieta não inibindo as bactérias e são absorvidos como componentes da dieta, sendo assim, o pH pode ser diminuído, impedindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (TUCKER, 2002).

Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, tendo como principal característica a volatilidade. Isto os diferencia dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, geralmente provenientes de sementes (ex.: óleo de rícino, manteiga de cacau e óleo de linhaça). Apresentam-se geralmente incolores ou levemente amarelados, com sabor ácido e picante, pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, além de serem pouco solúveis em água (SAITO; SCRAMIN, 2000).

Óleos essenciais de plantas mostraram ter atividade contra muitas espécies de bactérias: *Aromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*,

Enterococcus faecalis, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio para-haemolyticus*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus cereus*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e várias outras, Gram positivas ou negativas, aeróbias ou não (BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2003).

O efeito dos óleos essenciais sobre as bactérias dependem de uma série de fatores, dentre eles, a forma e a época de coleta da planta, podendo influenciar na composição dos constituintes que vão atuar sobre as bactérias e os microrganismos que se deseja combater, podendo ser uma ótima alternativa para substituir os antimicrobianos promotores de crescimento (SILVA et al., 2010).

Em ruminantes, a primeira visão da utilização de óleos essenciais na dieta é como uma alternativa de reutilização de subprodutos vegetais. Porém, as recentes pesquisas no uso de óleos essenciais em dietas de ruminantes procura entender sua atuação sobre o ambiente ruminal, precisamente, seu mecanismo de ação sobre a microflora ruminal. Ao conduzirem trabalhos com novilhos da raça holandes fistulados, utilizaram uma combinação de óleos essenciais e observaram uma depressão na concentração de amônia ruminal e do número de protozoários dos animais tratados (ANDO et al., 2003).

Cardozo et al., (2004), ao trabalharem com digestibilidade *in vitro* em animais que recebiam, isoladamente, extrato de canela, orégano, anis e alho, obtiveram modificações nos padrões de fermentação ruminal e de população microbiana quando comparados aos animais do grupo controle.

Molero, Ibars e Calsamiglia (2004) ao trabalharem com duas dietas com alto e baixo teor de concentrado, verificaram uma melhor atuação dos óleos essenciais sobre os parâmetros fermentativos e adaptação da flora microbiana, somente quando misturados à última dieta.

Newbold et al., (2004) desenvolveram trabalhos com ovinos fistulados, onde ocorreu uma ação antimicrobiana seletiva dos óleos essenciais sobre a flora ruminal, observando alterações na degradação da proteína e no processo de deaminação no rúmen.

4.1 Caracterização dos óleos essenciais

Compostos secundários são substâncias ausentes de função relacionada aos processos bioquímicos primários dos vegetais. Seus principais exemplos são os óleos essenciais, as saponinas e os taninos. A finalidade dos mesmos é promover proteção contra predadores (ex: insetos e animais herbívoros), microrganismos patogênicos e outros eventuais invasores. Também conferem odor e cor aos vegetais, atuando como mensageiros químicos entre a planta e o ambiente, de maneira a atrair insetos polinizadores e animais dispersores de sementes (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Óleos essenciais são substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis obtidas dos mais variados órgãos vegetais em geral via extração a vapor ou por solventes. Seus compostos mais importantes são incluídos em dois grupos químicos: terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Figura 1).

Figura 1 - Fórmula estrutural de alguns óleos essenciais. A: monoterpenos; B: sesquiterpenos; C: fenilpropanóides

Fonte: Adaptado de Calsamiglia et al. (2007).

Óleos essenciais não são propriamente “essenciais”, e recebem tal nome devido ao cheiro prazeroso que possuem (*quinta essentia* é o termo cunhado no século XVI por Paracelsus von Hohenheim para denominar o composto ativo de uma droga). Terpenóides (terpenos contendo oxigênio como elemento adicional) formam um grupo variado de substâncias cuja estrutura básica deriva do isopreno (C_5H_8 ; Figura 2). São classificados de acordo com o número de isoprenos em seu esqueleto (CALSAMIGLIA et al., 2007). Monoterpenos possuem duas unidades C_5 , sesquiterpenos possuem três unidades e os diterpenos quatro. Os maiores terpenos são os hemiterpenos (C_{15}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e os politerpenos ($((C_5)_n$, sendo $n > 8$; TAIZ; ZIEGER, 2004).

Várias são as funções químicas encontradas nos óleos essenciais, a exemplo do hidrocarboneto (apenas C e H), álcool ($C_{sat}-OH$), aldeído ($H-C=O$), cetona [$R-C(=O)-R'$], éster ($R-COOR'$), éter ($R-O-R'$) e fenol (Caromático- OH). Estima-se que 3000 tipos de óleos essenciais sejam conhecidos pela ciência, cerca de 300 deles com aplicações comerciais. Exemplos são a preservação e aromatização de alimentos, produção de perfumes, cosméticos e repelentes, produção de antimicrobianos e antiinflamatórios (CALSAMIGLIA et al., 2007).

4.2 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais

Os possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais sobre uma célula bacteriana estão esquematizados na (Figura 2). As ações estão em sua maioria associadas à membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzimo-dependentes (DORMAN; DEANS, 2000).

Figura 2 - Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais

Fonte: Adaptado de Burt (2004)

Os mecanismos que conferem aos óleos essenciais suas propriedades antimicrobianas ainda não são bem compreendidos (LAMBERT et al., 2001). Considerando a variada gama de substâncias químicas presentes nos óleos essenciais, é natural que a atividade antimicrobiana não seja mediada por um único mecanismo específico, havendo sinergia entre os modos de ação encontrados nos diversos compostos. Como exemplo, a atividade antimicrobiana ruminal do óleo de alho é mais potente do que a atividade de seus componentes isolados. Da mesma forma, efeitos aditivos ou antagônicos são também possíveis de ocorrer (BURT, 2004).

Óleos essenciais são substâncias hidrofóbicas, o que lhes confere a capacidade de interagir com lipídios da membrana celular e das mitocôndrias das bactérias. Isto ocorre quando o óleo encontra-se sob forma indissociada (mais hidrofóbica), o que nas condições ruminais é favorecido pelo baixo pH (CALSAMIGLIA et al., 2007). A hidrofobicidade está diretamente relacionada à ação antimicrobiana. Mendoza, Wilkens e Urzua (1997) demonstraram que a inclusão de um grupamento metil reduziu drasticamente o potencial antimicrobiano do diterpenóide estudado, isso graças ao aumento da interação com a água propiciada pelo grupamento metil. A interação óleo essencial/membrana celular altera a estrutura das mesmas, tornando-as mais fluidas e permeáveis, o que permite o extravasamento de íons e outros conteúdos citoplasmáticos. O carvacrol, um dos terpenos mais estudados no ambiente ruminal, é capaz de dissolver a dupla camada fosfolipídica da membrana celular,

alinhando-se entre os ácidos graxos. Isto promove a formação de canais na membrana, já que os óleos essenciais são capazes de separar os ácidos graxos uns dos outros. Tais distorções na estrutura física da membrana causam expansão e desestabilização, aumentando a fluidez e a permeabilidade passiva (LAMBERT et al., 2001).

Extravasamento de íons é outro mecanismo. Observou-se que o óleo essencial de orégano (basicamente composto por carvacrol e timol) promoveu o extravasamento de íons fosfato. Ultee, Kets e Smid (1999) verificaram que o carvacrol causou perda de íons potássio, devido ao aumento na concentração externa e diminuição na concentração interna desse íon. O mecanismo de atuação do carvacrol é apresentado na figura 3, sendo semelhante ao dos ionóforos. A célula bacteriana pode tolerar certa perda de íons do conteúdo celular sem comprometimento de sua viabilidade. Para tanto, há gasto de energia para acionar suas bombas iônicas. Entretanto, o extravasamento exagerado de íons e moléculas vitais pode levar a célula à morte. Mesmo não havendo morte direta, no ambiente ruminal, a perda de conteúdo citoplasmático e o gasto extra de energia fazem com que haja diminuição da população bacteriana em questão, já que essas perderiam viabilidade em um ambiente extremamente competitivo como o rúmen.

Figura 3 - Mecanismo de ação do carvacrol. Na forma indissociada, o carvacrol se difunde pela membrana citoplasmática e atinge o interior da célula, ocorrendo dissociação e liberação de próton. Em seguida, o carvacrol dissociado liga-se ao K^+ , retornando ao meio extracelular e carregando consigo este íon ou outro qualquer. No exterior, ocorre nova dissociação, com liberação do K^+ e recuperação de novo H^+ , fechando-se o ciclo

Fonte: Adaptado de Ultee, Bennink e Moezelaar (2002).

A estrutura química é a responsável pelo modo de ação e atividade antimicrobiana de cada óleo essencial. A presença do grupo hidroxila ($-OH$) nos compostos fenólicos é fundamental para a existência da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Todavia, a posição da hidroxila no anel fenólico parece ser menos importante, já que o timol e o carvacrol (Figura 1) apresentaram atividades semelhantes frente a variadas bactérias. Contudo, já foram constatadas diferenças na ação do timol e carvacrol contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000).

A presença do radical metil ($-CH_3$) ou do acetato (CH_3COO^-), assim como o próprio anel fenólico *per se*, também afetam as propriedades antibacterianas de cada óleo essencial (BURT, 2004). No ambiente ruminal, monoterpenos com as funções álcool e aldeído parecem ter maior efeito antimicrobiano, enquanto os monoterpenos hidrocarbonetos causam pequena inibição e, algumas vezes, inclusive estímulo à atividade microbiana (CALSAMIGLIA et al., 2007).

É de consenso na literatura que os óleos essenciais são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativo (BURT, 2004), o que infere a possibilidade de efeitos semelhantes aos dos ionóforos. Nas bactérias Gram-positivas, o óleo essencial pode interagir diretamente com a membrana celular. Em contrapartida, a parede celular externa que envolve a membrana das bactérias Gram-negativas é hidrofílica, o que impede a entrada de substâncias hidrofóbicas.

Mesmo assim, a membrana externa das Gram-negativas confere apenas proteção parcial, pois não é totalmente impermeável a substâncias hidrofóbicas. Compostos de baixo peso molecular, a exemplo do carvacrol e timol, podem interagir com a água via pontes de hidrogênio. Assim, por meio da difusão, essas substâncias cruzam a parede externa através dos lipopolissacarídeos ou proteínas da membrana, chegando à dupla camada fosfolipídica da parede celular interna da bactéria Gram-negativa. Este é um dos principais fatores que conferem ao carvacrol uma potente atividade antimicrobiana. A verificação dos efeitos de alguns óleos essenciais sobre bactérias Gram-negativas constitui-se numa clara limitação, já que esta propriedade reduz a seletividade e aumenta a dificuldade de manipulação da fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Alguns outros mecanismos de ação também já foram verificados. Certas substâncias parecem atuar nas proteínas da membrana citoplasmática. Em geral, os compostos fenólicos interagem com as proteínas por meio de pontes de hidrogênio e interações iônicas ou hidrofóbicas. Outro mecanismo existente é a redução da concentração interna de ATP sem aumento proporcional na concentração externa, o que transparece a ideia de menor síntese ou maior hidrólise do mesmo (ULTEE; KETS; SMID, 1999).

Enzimas como as ATPases são conhecidas por localizarem-se na membrana citoplasmática, rodeadas por moléculas de lipídios. Dois possíveis mecanismos de ação são sugeridos: a) hidrocarbonetos lipofílicos podem se acumular na dupla camada de lipídios da membrana celular, o que pode distorcer as interações entre proteínas e lipídios; b) é possível que óleos essenciais possam interagir diretamente com os sítios hidrofóbicos das proteínas da membrana (JUVEN et al., 1994).

Adicionalmente, crê-se que óleos essenciais atuem em enzimas envolvidas nos processos de regulação de energia e de síntese de componentes estruturais. Como exemplo, o óleo de canela (cinamaldeído ou 3-fenil-2-propenal) e seus componentes foram eficientes em inibir as enzimas aminoácido-descarboxilases de *Enterobacter aerogenes*. Neste caso, substâncias fenólicas como o cinamaldeído não são capazes de desintegrar a membrana externa ou causar depleção de ATP. Imagina-se que o grupo funcional carbonil (R1-CO-R2)

seja o responsável por se ligar às proteínas, inibindo a ação das aminoácido-descarboxilases. Também já se demonstrou que o eugenol [2- metoxi-4-(2-propenil)fenol] inibiu a produção de amilases e proteases por *Bacillus cereus*.

Por fim, substâncias ativas presentes no óleo de alho podem inibir a síntese de RNA, DNA e proteínas celulares. O óleo de alho reduz a produção de metano (CH₄) ruminal *in vitro*. Sugere-se que o efeito ocorra via ação direta sobre a metanogênese, diminuindo as populações de *Archaea* por inibição da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMGCoA). Compostos organossulfurados encontrados no óleo de alho são capazes de inibir esta enzima, essencial para a síntese das unidades isoprenóides formadoras da membrana lipídica das *Archaea* (THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisas em Alimentação e Fisiologia do Exercício em Equinos (LABEQUI), do Departamento de Nutrição e Produção Animal, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), na cidade de Pirassununga/SP.

5.2 Animais

Foram utilizados oito animais da raça Mini-horse, machos, castrados, com idade de 42 ± 6 meses, peso médio inicial de 135 ± 15 Kg, imunizados contra tétano, vermifugados e pulverizados contra ectoparasitas.

5.3 Dieta e Procedimento Experimental

Foi utilizada dieta de alta proporção concentrado:volumoso, constituída de 60% concentrado comercial peletizado e 40% de feno, (*Cynodon dactylon* (L.) Pers cv. Tifton 85) cuja variação foi a inclusão de um composto de óleos essenciais, com níveis de 0ppm (controle), 100ppm, 200ppm, e 300ppm, de produto¹ com concentração de 7% de carvacrol. Os níveis de inclusão utilizados foram os mesmos estudados por Oetting et al. (2006) em leitões, e Ilsley et al. (2006) com porcas em lactação.

A composição bromatológica do concentrado comercial peletizado² e do volumoso utilizado na dieta estão descritas, respectivamente, nas (Tabelas 1 e 2).

¹ Activo Select – Grasp®

² Equinos 15-Multipartículas - Algomix®

A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, com intervalos constantes as 7:00 h e 19:00 h, sendo a dieta total (feno + concentrado) dividida em partes iguais entre os dois horários. Foi adotado o consumo diário individual de 2,0% do peso vivo em matéria seca, excedendo as exigências da categoria, segundo (NRC, 2007). O concentrado foi fornecido em comedouro separado do volumoso simultaneamente de acordo com modelo proposto por Carvalho (1992).

As frações dos tratamentos (100, 200 e 300 ppm) foram diluídas em 5 gramas de farinha de milho (1 mm), utilizando misturador do tipo “V” da empresa Marconi® modelo MA200, e acondicionadas em doses individuais. A cada refeição, a fração correspondente ao tratamento foi adicionada ao concentrado no comedouro. Água e suplemento mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Tabela 1 - Composição bromatológica do concentrado comercial utilizado na dieta experimental

Nutrientes (%)	Concentrado
Matéria Seca (MS)	89,80
Proteína Bruta (PB)	17,45
Fibra solúvel em detergente neutro (FDN)	31,38
Fibra solúvel em detergente ácido (FDA)	16,24
Matéria Mineral (MM)	6,59
Extrato Etéreo (EE)	5,45
Cálcio (Ca)	1,12
Fósforo (P)	0,69
Amido	24,25

Tabela 2 - Composição bromatológica do feno de gramínea utilizado na dieta experimental

Nutrientes (%)	Feno
Matéria Seca (MS)	91,15
Proteína Bruta (PB)	7,12
Fibra solúvel em detergente neutro (FDN)	70,52
Fibra solúvel em detergente ácido (FDA)	35,70
Matéria Mineral (MM)	5,31
Extrato Etéreo (EE)	1,11
Cálcio (Ca)	0,49
Fósforo (P)	0,22
Amido	1,24

5.4 Metodologias de Coletas e Processamento das amostras

O experimento foi constituído de quatro períodos de 23 dias cada, sendo os 15 primeiros dias de adaptação à dieta, com 5 dias para a coleta de amostras e 3 dias de intervalo entre os períodos.

Os animais foram alojados em baias individuais de 2,5 x 3,0 m, com piso de concreto forrado com cama de maravalha, durante o período de adaptação. A cada intervalo entre os períodos experimentais, os animais foram soltos em piquete e no início e final de cada período, os animais foram pesados para ajuste de dieta em relação ao peso corporal.

Amostras dos alimentos fornecidos foram retiradas diariamente, a cada período experimental, formando uma amostra composta e acondicionada em sacos plásticos para análise posterior.

5.4.1 Digestibilidade aparente total

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta foram estimados através do método da coleta total de fezes. O ensaio foi realizado em período de 5 dias, com animais mantidos em baias com piso de concreto sem cama. As fezes recolhidas foram acondicionadas em sacolas plásticas, pesadas a cada 24h, identificadas por animal e, do total excretado, após homogeneização, foi retirado uma alíquota de 10%, acondicionado em sacos plásticos e congeladas à -20°C .

Ao final dos quatro períodos de coletas, as amostras de fezes totais, dos alimentos fornecidos foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas manualmente, pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C , por 72h. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinhos com peneira de furos de 1 mm. Amostras compostas de fezes foram feitas com base no peso seco, para cada animal e período. Todas as amostras após serem moídas, foram acondicionadas em embalagens plásticas e identificadas para posterior análise.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CD) dos nutrientes dos ensaios de digestão com coleta total de fezes foram estimados por meio da equação descrita por Schneider e Flatt (1975).

$$CD (\%) = \frac{MS \text{ consumida} \times (\% \text{ nutriente na dieta}) - MS \text{ fezes} \times (\% \text{ nutriente nas fezes}) \times 100}{MS \text{ consumida} \times (\% \text{ nutriente na dieta})}$$

5.4.2 Glicose e Insulina

As análises das respostas glicêmicas e insulinêmicas foram realizadas no primeiro dia de colheita de fezes de cada período experimental. As amostras de sangue foram colhidas em tubos previamente preparados com estabilizantes (citrato), por venopunção da veia jugular, 30 minutos antes, 30 minutos, 90 minutos, 150 minutos, 210 minutos após o fornecimento da dieta do período da manhã (STULL; RODIEK, 1988). As amostras foram centrifugadas para separação de soro e acondicionadas em microtubo de 2 mL.

5.4.3 pH fecal

Foi aferida a curva de pH nas fezes no segundo dia de coleta de fezes, sendo estabelecido 4 faixas de horários para coleta das amostras, sendo que cada faixa representa 3 h, totalizando 4 faixas e 12h de coleta de fezes, sendo F1 = (07-10h), F2 = (10-13h), F3 = (13-16h) e F4 = (16-19h), as amostras de fezes para mensuração do pH foram coletas nos momentos de defecação espontânea (50g) e enquadrada na faixa de horário correspondente (BERG et al., 2005).

5.4.4 Gordura plasmática

Para análise dos lipídeos plasmáticos foram colhidas amostras sanguíneas no último dia de cada fase de colheita de fezes, antes da primeira refeição matutina, como sugerido por Marchello et al. (2000). As colheitas foram realizadas através de venunpunção da veia jugular, em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante e com capacidade para 5mL, posteriormente foram centrifugadas e o soro acondicionado em microtubos de 2ml.

5.5 Análises laboratoriais

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), proteína bruta (PB), amido, matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE) foram realizados segundo a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002).

As amostras de pH fecal eram transferidas para tubos plásticos, acrescidas de 50ml de água deionizada e misturadas por aproximadamente 20s e submetidas a leitura do pHmetro³ (Quimis®) (BERG et al., 2005).

A análise de cálcio (Ca) foi realizada pelo método de titulometria com EDTA e para análise de fósforo (P) foi utilizado o método calorimétrico (AOAC, 1980).

Para dosagem de glicose foi utilizado o método de espectrofotometria enzimática descrita por Bergmeyer (1975) e Tonkk (1972) com analisador RX Daytona Randox®.

A dosagem de insulina plasmática foi analisada pela técnica de quimioluminescência, com o método descrito por Yalow e Berson (1960).

O perfil de gordura plasmática representa a mensuração de triglicerídeos, colesterol total, e frações de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), foram determinados pelo método de espectrofotometria com analisador RX Daytona Randox® pelo método de Lowry (1977).

5.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo 4x4 (quatro animais, quatro tratamentos) com medidas repetidas no tempo. Os resultados de digestibilidade, pH fecal, glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e frações colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo e regressão

³ Quimis®

polinomial pelo procedimento PROC MIXED do SAS, versão 9.1 (2004).

As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), o modelo incluiu efeitos fixos de tratamento, tempo, interação tratamento x tempo, e os efeitos aleatórios de animal e período.

As áreas abaixo da curva (AAC) foram calculadas para o intervalo total, que compreendeu os tempos de -30, 30, 90, 150 e 210 minutos pós-prandial, que foi realizado pelo procedimento do PROC EXP do SAS e por regressão polinomial simples, de acordo com os níveis de inclusão de óleo essencial.

5.7 Análises estatísticas

Os coeficientes de digestibilidade, pH fecal, níveis plasmáticos de glicose e insulina e perfil de gordura plasmática foram analisados pelo programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS, 2004), verificando-se anteriormente a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (Proc Univariate) e a homogeneidade das variâncias pelo teste F.

Os níveis plasmáticos de glicose e insulina foram analisados pela área abaixo da curva (AAC) que foi realizado através do PROC EXP e por regressão polinomial simples de acordo com os 4 níveis de inclusão do óleo essencial carvacrol pelo PROC REG do SAS e suas médias ajustadas foram comparadas através do teste de TUKEY pelo PROC MIXED.

A resposta glicêmica e insulinêmica em função do tempo foi realizada através de medidas repetida no tempo pelo PROC MIXED e por regressão polinomial simples de acordo com os 4 níveis de inclusão do óleo essencial carvacrol pelo PROC REG.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Radicke (1994) a ingestão de 2g/kg de amido pode ultrapassar a capacidade do intestino delgado em degradar amido, podendo alterar a população microbiana e os padrões fermentativos no intestino grosso.

A dieta fornecida aos animais durante todos os períodos do experimento demonstrou ser adequada para manutenção da higidez, no período de experimentação não foi registrado perda de peso, distúrbios metabólicos inerentes a dieta e ao óleo essencial. Não foram observadas alterações de consistência e aspecto das fezes. Foi observado um ganho de peso médio de $6,06 \pm 3,2$, a dieta determinada era superior as exigências da categoria e a ingestão diária de amido foi de 2,69g/kg.

Os dados referentes a digestibilidade aparente, pH fecal, glicemia, insulina, triglicerídeos, colesterol total e frações colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), para a dieta composta por concentrado:volumoso (60:40), com níveis de inclusão de óleos essenciais estão descritos a seguir.

6.1 Digestibilidade aparente

Os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente total da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra solúvel em detergente neutro, fibra solúvel em detergente ácido e matéria mineral com inclusão de óleo essencial nos níveis (0, 100, 200 e 300 ppm), não apresentaram efeito de tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os coeficientes de digestibilidade aparente, para os tratamentos 0, 100, 200, 300 ppm de inclusão diária de óleo essencial

Variáveis¹	Tratamentos ²				EPM	Valor de P		
	0	100	200	300		Tratamento	Linear	Quad
MS	63,78	65,80	64,28	63,68	0,66	0,48	0,70	0,23
MO	66,26	67,82	66,96	66,45	0,62	0,66	0,94	0,29
PB	75,41	74,82	74,97	74,48	0,57	0,58	0,31	0,37
EE	75,79	71,85	71,39	73,69	1,54	0,64	0,58	0,25
MM	25,54	27,62	25,92	23,85	0,99	0,55	0,42	0,27
FDN	46,12	50,08	47,22	46,10	1,28	0,58	0,78	0,28
FDA	44,62	49,77	45,59	43,58	1,48	0,46	0,57	0,22

6.1.1 Digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica

Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO) não apresentaram efeito de tratamento (Figura 4), corroborando com o estudo de Tekippe et al. (2010) que utilizando 5,7 gramas/dia de carvacrol na dieta de vacas em lactação não observaram efeito na digestibilidade aparente de MS (63%), MO (64%).

Isley et al. (2006) utilizando um blend de óleos essenciais com níveis de 5ppm de carvacrol, 3 ppm de cinemaldeído e 2 ppm de capsaicina com porcas em lactação, não observou efeito sobre a digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica.

Oetting et al. (2006) estudaram os níveis de extrato vegetal com 23, 46, 69 ppm de carvacrol em leitões desmamados, observou-se efeito ($P<0,05$) sobre a digestibilidade da matéria seca. De acordo com os autores, a suplementação com extratos vegetais aumentou a digestibilidade dos nutrientes e favoreceu o equilíbrio da microbiota, diminuindo o potencial de adesão de patógenos ao epitélio intestinal.

Figura 4 - Média dos coeficientes de digestibilidade aparente da MS e MO, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais

6.1.2 Digestibilidade aparente do FDN e FDA

Os coeficientes de digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) não apresentaram efeito de tratamento (Figura 5), corroborando com o estudo de Tekippe et al. (2010) que utilizando 5,7 gramas/dia de carvacrol na dieta de vacas em lactação não observaram efeito na digestibilidade aparente de MS (63%), MO (64%).

Um estudo avaliando níveis de inclusão de óleo de soja observou coeficientes de digestibilidade para FDN com valores entre (42,54 – 54,49%) e para FDA (35,50 – 49,70%) (PASTORI et al., 2009). Esses dados são semelhantes aos valores apresentados.

Figura 5 - Média dos coeficientes de digestibilidade aparente do FDN e FDA, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais.

6.1.3 Digestibilidade aparente da proteína bruta

O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (PB) não apresentou efeito de tratamento, os coeficientes estão apresentados na (Figura 6), os valores encontrados são semelhantes aos observados por (GIL, 2009) utilizando maldodextrina na substituição do amido, o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta foi de 68,56 – 79,70%.

Isley et al. (2006) utilizando um blend de óleos essenciais com 5ppm de carvacrol, 3 ppm de cinemaldeido e 2 ppm de capsaicina em porcas em lactação, observou efeito sobre a digestibilidade aparente da proteína bruta apenas na primeira semana de lactação.

Figura 6 - Média dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais

6.1.4 Digestibilidade aparente do extrato etéreo

As gorduras suplementadas a dieta são bem digeridas pelos equinos e são primordialmente degradadas e absorvidas no intestino delgado, porém, uma porcentagem do extrato etéreo pode escapar desse processo e alcançar o ceco e cólon. Um aumento da inclusão de óleo na dieta pode acarretar em maior quantidade de gordura não digerida que chega ao intestino grosso dos animais, alterando a digestibilidade da fibra.

A inclusão de óleo essencial na dieta não alterou a digestibilidade da fibra, o coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo não apresentou efeito de tratamento ($P= 0,64$), os coeficientes estão apresentados na (Figura 7), os valores encontrados corroboram com dados observados por (GIL, 2009; PASTORI et al., 2009).

Figura 7 - Média dos coeficientes de digestibilidade aparente do extrato etéreo, em função dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais

6.2 pH fecal

Em um estudo com simulações de fermentação *in vitro* da microbiota intestinal de suínos foi concluído que o carvacrol é um potente inibidor de crescimento microbiano, seletivo como antimicrobianos, principalmente com *Lactobacillus* spp, estes compostos fenólicos atuam principalmente nas porções próximas do trato gastrointestinal dos suínos e com pH ácido, reduzindo a carga bacteriana, Michiels et al. (2007) relata que esse modelo experimental *in vivo* poderia implicar mais dificuldades provenientes da degradação e rápida absorção reduzindo os efeitos e necessitando de doses mais elevadas, sugerindo estudos com técnicas apropriadas de liberação do carvacrol.

Não foi observado efeito dos níveis de inclusão de óleo essencial sobre o pH das fezes, apesar da diferença numérica, os valores de pH fecal (Gráfico 1) não foram significantes para os níveis de inclusão do óleo essencial, onde $P = (0,17)$, (Tabela 4).

Piva et al. (2002) estudaram os efeitos do carvacrol sobre enterobactérias em fezes de suínos colhidas 20 minutos após o abate e observaram que o nível foi menor em 24% no tratamento em que foi adicionado o carvacrol nas amostras de fezes, em relação ao tratamento controle, a taxa de produção de gases foram 13% e 21% mais baixos quando medidos as 8 e 24 horas, respectivamente, após o início da fermentação.

Tabela 4 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os valores de pH fecal, de acordo com os tratamentos (controle, 100, 200 e 300ppm) de inclusão diária de óleo essencial.

Variável	Tratamento ¹				EPM	Valor de P
	0	100	200	300		Tratam
pH	6,36	6,36	6,40	6,36	0,1135	0,845

As mudanças dos valores de pH fecal estão relacionados com as fermentações ocorridas no intestino grosso que podem sofrer alterações conforme a composição da dieta. As modificações na proporção entre forragem e concentrado são capazes de alterar os produtos finais e o local da digestão de uma dieta (HINTZ et al., 1971b).

Gráfico 1 - Média dos valores de pH fecal, em função do tempo, Faixa 1 (7-10h); Faixa 2 (10-13h); Faixa 3 (13-16h) e Faixa 4 (16-19h), e dos tratamentos experimentais 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleos essenciais

6.3 Glicose

A concentração plasmática de glicose após a ingestão de alimento, chamada de resposta glicêmica, pode ser influenciada por vários fatores tais como, o tamanho da partícula, o grau de processamento térmico, a composição em proteína, gordura e fibra do alimento, a estrutura bioquímica e o processo de absorção do carboidrato, o conteúdo e intervalo de tempo da refeição anterior (RALSTON; BAILE, 1982).

No presente estudo com inclusão de óleo essencial na dieta não foi observado efeito de interação (tratamento x tempo) (Tabela 5), mas foi observada diferença numérica entre os tratamentos, sendo mais acentuados nos tempo de 90, 150 e 210 min (Figura 8), momento que representa o pico da curva glicêmica, os valores médios observados asseguram que a dieta estabelecida e inclusão de óleo essencial não prejudicaram os valores de referência para glicose, mas essa diferença pode ocorrer pela ação antimicrobiana do carvacrol sobre bactérias amilolíticas, resultando em menor absorção de glicose, porém os valores de 300 ppm são semelhantes ao controle.

Os valores de resposta glicêmica encontrados estão dentro dos parâmetros de referência (75-115 mg/dl) preconizados por (MEYER, 1995), onde a glicemia em jejum varia entre 80 a 100mg/dL, e após as refeições, ricas em amido, pode elevar a 150 mg/dL no prazo de 2-3 horas. Estas concentrações são mantidas através da gliconeogênese, principalmente no fígado, e são regulados pelo glucagon, cortisol e outros hormônios contrarreguladores (ANDERSON, 1997).

Tabela 5 - Médias e desvio padrão (EPM) para as concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) de acordo com os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de óleos essenciais, e tempo (-30, 30, 90, 150, 210 minutos).

Trat	Tempo				
	-30	30	90	150	210
0	85.82±8,2 ^{ba}	98.61±10,3 ^{abA}	124.23±18,9 ^{aA}	125.54±23,9 ^{aA}	108.73±20,4 ^{abA}
100	85.11±8,1 ^{ba}	99.94±10,4 ^{abA}	112.91±17,7 ^{abA}	122.02±22,0 ^{aA}	119.47±20,2 ^{abA}
200	85.77±8,1 ^{aA}	98.43±10,4 ^{aA}	107.25±17,8 ^{aA}	114.19±22,1 ^{aA}	114.04±20,1 ^{aA}
300	85.80±8,0 ^{ba}	100.71±10,1 ^{abA}	121.36±16,4 ^{aA}	118.74±20,8 ^{abA}	104.55±19,3 ^{abA}

Os valores encontrados nesse estudo corroboram com os dados descritos por Taran (2011) avaliando resposta glicêmica em pôneis suplementados com levedura. Na avaliação da área abaixo da curva, foi observado (P = 0,48) para efeito de tratamento (Tabela 6).

Tabela 6 – Área abaixo da curva (AAC), das concentrações de glicose de acordo com os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de óleos essenciais.

Variaveis	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	Tratamento					Trat,	Linear	Quad
	0	100	200	300				
Glucose	447,28	432,88	426,40	433,26	8,31	0,480	0,267	0,277

Figura 8 - Área abaixo da curva (AAC) da concentração plasmática de glicose (mg/dL) nos tempos (-30, 30, 90, 150 e 210 minutos) para os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de inclusão de óleo essencial

6.4 Insulina

Os concentrados à base de grãos são ricos em amido e a habilidade do cavalo em digerir este substrato no intestino delgado é limitada. Alimentos constituídos de grandes quantidades de carboidratos não estruturais estimulam a resposta insulinêmica, de modo a manter a glicemia, prevenindo a hiperglicemia, podendo tanto originar a resistência à insulina como alterar negativamente a microbiota no intestino grosso devido uma ingestão excessiva, mostrando que essa associação pode acarretar desordens digestivas e metabólicas (TREIBER et al., 2005).

Analisando as médias da resposta plasmática de insulina nos tempos (-30, 30, 90, 150 e 210 min) (Tabela 7), foi observado efeito de tratamento considerando ($P < 0,05$) nos tempos (90, 150 e 210 minutos) para os grupos (controle e 300 ppm) (Figura 9), os valores plasmáticos correspondentes são respectivamente mais elevados, entretanto, os valores encontrados para glicose plasmática no tempos e tratamentos equivalentes foram numericamente mais elevados que os demais, portanto, representam o momento de maior concentração plasmática devido a resposta da alimentação. Os valores de insulina encontrados foram semelhantes aos estudos de Taran (2011) avaliando resposta plasmática de insulina fornecendo alta relação de concentrado: volumoso para pôneis da raça Mini-horse.

Os níveis mais elevados de insulina encontrados podem ser decorrentes da dieta proposta, onde a relação concentrado: volumoso foi de (60:40), com aporte maior de amido a glicemia aumenta concomitantemente, estimulando o pâncreas a secretar insulina, portanto maiores níveis de glicose estimulam diretamente a insulinemia.

Tabela 7 Médias e desvio padrão (DP) para as concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/dL}$) de acordo com os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de óleos essenciais, e tempo (-30, 30, 90, 150, 210 minutos).

Tratamento	Tempo				
	-30	30	90	150	210
0	5.10 $\pm$ 1,45 ^{dA}	15.10 $\pm$ 8,49 ^{cA}	55.72 $\pm$ 53,7 ^{bA}	72.72 $\pm$ 59,6 ^{aA}	58.22 $\pm$ 47,0 ^{bB}
100	4.50 $\pm$ 1,92 ^{eA}	13.37 $\pm$ 7,44 ^{dA}	30.87 $\pm$ 31,1 ^{cB}	59.12 $\pm$ 71,1 ^{bB}	70.80 $\pm$ 92,5 ^{aA}
200	3.89 $\pm$ 2,53 ^{dA}	14.02 $\pm$ 8,58 ^{cA}	43.27 $\pm$ 51,3 ^{bAB}	57.52 $\pm$ 63,9 ^{aB}	63.27 $\pm$ 71,3 ^{aAB}
300	4.50 $\pm$ 1,19 ^{dA}	16.75 $\pm$ 10,3 ^{cA}	59.87 $\pm$ 61,5 ^{bA}	77.25 $\pm$ 90,8 ^{aA}	70.87 $\pm$ 77,4 ^{aA}

Figura 9 - Área abaixo da curva (AAC) da concentração plasmática de insulina ($\mu\text{U/dL}$) nos tempos (-30, 30, 90, 150 e 210 minutos) para os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de inclusão de óleo essencial

No estudo da resposta insulinêmica foi observado efeito quadrático para avaliação da área abaixo da curva (Tabela 8), a equação de regressão que representa a área abaixo da curva da insulina é descrita pela função ($Y=169,70-0,44X +0,001X^2$ $R^2 = 0,12$) (Gráfico 2). Analisando esta função foi observado ponto de mínimo para 220ppm/dia de óleo essencial, sendo a concentração de insulina correspondente 121 $\mu\text{U/mL}$.

Tabela 8 – Área abaixo da curva (AAC), das concentrações de insulina de acordo com os Tratamentos 0 ppm(controle), 100 ppm, 200 ppm e 300 ppm de inclusão diária de Carvacrol.

Variáveis ²	Dietas experimentais ¹				EPM	Valor de P		
	Tratamento					Trat,	Linear	Quad
	0	100	200	300				
Insulina	170,31	141,06	152,19	191,56	27,54	0,208	0,340	0,050

Gráfico 2- Área abaixo da curva da concentração de insulina calculada e observa para os tratamentos 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial.

6.5 Triglicérides

As concentrações plasmáticas de triglicérides se apresentaram dentro dos parâmetros fisiológicos descritos por Bruss (1980) para a espécie equina, os valores de triglicerídeos variam dentro entre 4 a 44 mg/dL.

Não foi observado efeito de tratamentos para os valores de triglicerídeos ($P = 0,37$) (Tabela 9), os valores foram semelhantes para todos os tratamentos (Figura 10) corroborando com os dados de Bortoli (2007) que avaliou o perfil plasmático de triglicérides em novilhas da raça Jersey suplementadas com aditivos fitogênicos, os valores de foram semelhantes aos encontrados nesse experimento, com valores médios de 28,40mg/dL para grupo tratado e 27,00mg/dL para o Controle.

Cho et al. (2012) avaliaram a concentração plasmática de triglicerídeos em camundongos alimentados com dieta rica em gordura com aditivo carvacrol, porém, não observaram efeito de tratamento nas concentrações plasmáticas.

Em outro estudo foi avaliado os efeitos do carvacrol sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em frangos, utilizando a dose de 300 mg/Kg de carvacrol na dieta, não observaram efeito sobre o parâmetro avaliado (KIRKPINAR; ÜNLÜ; ÖZDEMİR, 2001).

Tabela 9 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os valores de triglicérides de acordo com os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de óleos essenciais.

Variável	Tratamento ¹				EPM	Valor de P		
	0	100	200	300		Tratam	Linear	Quad
Triglicérides mg/dl	28,99	26,66	32,42	30,75	2,3402	0,3724	0,3053	0,8893

Figura 10 - Média dos valores de concentração plasmática de triglicerídeos (mg/dL), para os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de inclusão de óleo essencial

6.6 Colesterol total e frações ligadas a proteína

Em equinos, a maior parte do colesterol plasmático está em HDL, ao contrário do homem onde a maior parte se encontra nas frações LDL e VLDL (WATSON; PACKARD; SHEPERD, 1993).

Não foi observado efeito de tratamento sobre a concentração plasmática de colesterol total e frações ligadas a lipoproteína HDL, LDL e VLDL (Tabela 10).

Os valores de colesterol total observado estão dentro do parâmetro fisiológico descrito por Bruss (1980), os resultados apresentados corroboram com estudo realizado por Pastori et al. (2009) utilizando níveis de óleo de soja na dieta de potros.

Kirkpinar, Ünlü e Özdemir (2001) estudaram os efeitos do carvacrol sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total em frangos, utilizando 300 mg/Kg de carvacrol na dieta e não observaram efeito sobre esses parâmetros avaliados.

Akkol et al. (2009) realizaram um estudo avaliando ratos alimentados com dieta rica em gordura e suplementados com carvacrol extraído da planta *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, a dose utilizada foi de 100 mg/kg, observaram efeito sobre os níveis de colesterol total e LDL-C, concluindo que o carvacrol pode suprimir a enzima 3-Hidróxi-3-Metilglutaril-CoA Redutase, limitando a síntese de colesterol.

A lipoproteína de alta densidade (HDL-C) tem como função captar o colesterol livre, de membranas, esterificá-lo e transportá-lo de volta ao fígado (GARCIA; OLIVEIRA, 1992). Na avaliação de (HDL-C) não foi observado efeito de tratamento, corroborando com estudo de Bortoli et al., (2007) que avaliou efeito de aditivos fitogênicos sobre perfil lipídico em novilhas da raça Jersey.

Cho et al. (2012) não observaram efeito na concentração plasmática de HDL-C em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e suplementados com carvacrol.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) funciona como fonte de colesterol, visando atender os requisitos dos tecidos extra-hepáticos, para síntese de membranas e hormônios esteroidais (GRUNDY, 1996). A concentração plasmática de LDL não apresentou efeito de tratamento (Figura 11), corroboram com os valores descritos por Yamamoto et al., (1979) que demonstraram valores 24,36 e 38,87 mg/dL, e apresentados por Watson, Packard e Sheperd (1993), com valores entre 15,47 e 31,71 mg/dL.

A lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) é secretada pela mucosa intestinal e possui função de transportar lipídeos (GARCIA; OLIVEIRA, 1992). Os valores médios de

VLDL encontrados não apresentaram efeito de tratamento corroborando com dados observados por Marchello et al. (2000) e Pastori et al. (2009).

Tabela 10 - Médias e erro padrão da média (EPM) para concentração plasmática de colesterol total, e frações HDL, LDL, VLDL de acordo com os tratamentos (0, 100, 200 e 300 ppm) de óleos essencial.

Variáveis¹ mg/dL	Tratamentos ²				EPM	Valor de P		
	0	100	200	300		Tratamento	Linear	Quad
Colesterol	105,97	103,01	105,81	104,46	1,982	0,69	0,85	0,69
HDL-C	67,96	65,93	66,71	66,61	1,275	0,72	0,57	0,45
LDL-C	35,44	35,64	36,26	35,18	1,339	0,94	0,98	0,64
VLDL-C	5,78	5,33	6,48	6,13	0,468	0,37	0,30	0,91

Figura 11 - Média dos valores de concentração plasmática de colesterol total, frações HDL-C, LDL-C e VLDL-C (mg/dL), para os tratamentos 0, 100, 200 e 300 ppm de inclusão de óleo essencial

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi conduzido, o efeito da suplementação do óleo essencial carvacrol na dieta de equinos, não influenciou nos resultados de digestibilidade aparente, resposta glicêmica, pH fecal, triglicérides, colesterol total, frações ligadas a lipoproteínas (HDL, LDL e VLDL) para os diferentes níveis de inclusão de óleo essencial.

A inclusão de óleo essencial na dieta influenciou a resposta insulinêmica, porém mais estudos com novos valores de inclusão em equinos devem ser pesquisados.

REFERÊNCIAS

- AKKOL, E. K.; AVCI, G.; KUCUKKURT, I.; KELES, H.; TAMER, U.; INCE, S.; YESILAD, E. Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 314-319, 2009.
- ANDERSON, R. A. Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: chromium. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 16, p. 404-10, 1997
- ANDO, S.; NISHIDA, T.; ISHIDA, M. *DESCREVER OS DEMAIS AUTORES*. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. **Livestock Production Science**, v. 82, p. 245-248, 2003.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, S. J.; SOUZA, A. G.; BONA FILHO, A. **Nutrição Animal/Alimentação Animal**. São Paulo: Nobel, 1984. v. 2, p. 299-307.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 13th ed. Washington, DC.: Association of Official Analytical Chemists, 1980.
- ARGENZIO, R. A.; HINTZ, H. F. Effect of diet on glucose entry and oxidation rates in pôneis. **Journal of Nutrition**, v. 102, p. 879-892, 1972.
- ASGARY, S.; SHAMS ARDEKANI, M.; S.; NADERI, G.; H. *DESCREVER OS DEMAIS AUTORES*. The antioxidant activity of the essential oils of Iranian conifers on red blood cell. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ATHEROSCLEROSIS, 13., 2003, Kyoto, Japan. **Proccedings...** 2003.
- BAGAMBOULA C. F.; UYTENDAELE M.; DEBEVERE J. Antimicrobial effects of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal Food Protec.** p. 668-673, 2003.
- BARCELLOS, D.; SOBESTIANSK, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura. 1ed. Goiânia: 103p, 1998.
- BERG, E. L.; FU, C. J.; PORTER, J. H.; KERLEY, M. S. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. **Jornal of Animal Science**, v. 83, p. 1549-1553, 2005.
- BERGMAYER, H. V. **Methods of enzymatic analysis**. local: Academic Press, 2nd ed. 1975. p. 1205-1214.
- BORTOLI, A. Influência de um aditivo fitogênico sobre o desempenho e condições metabólicas de novilhas Jersey. 2007. 68f. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

BRAGA, A. C. **Níveis de fibras na dieta total de equinos**. 2006. 46 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância da Saúde – ANVISA. **Resolução CNNPA nº 12 de 1978**. 1978. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e85b71804745886d9213d63fbc4c6735/Resolucao_CNNPA_n_12_de_1978.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 maio 2012.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos Campinas, SP. Anais. p.167-182, 2003.

BRUSS, M. L. Lipids and ketones. In: KANEKO, J. J. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic Press, 1980. p. 83-905.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223- 253, 2004.

CÁCERES, A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala**. Guatemala: Editorial Universitária, 1999. 402 p.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DESCREVER OS DEMAIS AUTORES Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3230-3236, 2004.

CHO, S.; CHOI, Y.; PARK, S.; PARK, T. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 192-201, 2012.

COHEN, N.D.; GIBBS, P.G.; WOODS, A.M. Dietary and other management factors associated with colic in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p.53-60, 1999.

CUNHA, J.T. **Feeding and Nutrition Horse**. University of Florida, Academic Press, ed.2, p.445, 1991.

DAVIDSON, K. E.; POTTER, G. D.; EVANS, J. W.; GREENE, L. W.; HARRIS, P. S.; CORN, C. D.; WEBB, S. P. Growth, nutrient utilization, radiographic bone characteristics and postprandial thyroid hormone concentrations in weanling horses fed added dietary fat. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 11, p. 119–125, 1991.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

- DROUGOUL, C.; FOMBELLE, A. de.; JULLIAND, V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: effect of three hay: grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. **Journal of equine Veterinary Science**, v. 21, n. 10, p. 487-491, 2001.
- DROUGOUL, C.; PONCET, C.; TISSERLAND, J. L. Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies 1. Consequences for in vivo digestibility and rate of passage of digesta. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, p. 117-130, 2000.
- ENGLYST, H. N.; HAY, S.; MACFARLANE, G. T. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, p.163-71, 1987.
- GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, H. C. F. Fisiologia das lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. (Ed.). **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. p. 1-30.
- GIL, P. C. N. **Uso da maltodextrina na substituição do amido em dieta para equinos**. 2009. 65f. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade São Paulo. São Paulo, 2009.
- GONZAGA, I. V. F.; GIL, P. C. N.; FRANÇOZO, R.; TARAN, F. M. P.; ETCHICHURY, M.; GAMEIRO, A. H.; GOBESSO, A. A. O. Avanços tecnológicos relacionados com o crescimento da equideocultura no Brasil. **Brazilian Journal of Equine Medicine**, v. 6, p. 4-7, 2010.
- GRAY, G. M. Starch Digestion and Absorption in Nonruminants, **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 172-177, 1992.
- GRUNDY, S. M. Dietary fat. In: ZIEGLER, E. E.; FILER JR., L. J. (Ed.). **Present knowlegde in nutrition**. 7. ed. Washington: ILSI, 1996. p. 44-57.
- GUERRA, P. J. Equinos: Brasil possui terceiro maior rebanho mundial de cavalos. **CAN**. n. 194, 2003.
- HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**. p.410-417, 2003.
- HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 169-174, 2004.
- HINTZ, H. F.; HOGUE, D. E.; WLAKER, E. F.; LOWE, J. E.; SCHRYVER, H. F. Apparent digestion in various segments of the digestive tract of ponies fed diets with varying roughage-grain ratios. **Journal of Animal Science**, v. 32, p. 245-248, 1971a.
- HINTZ, H. F.; ROBERTS, S. J.; SABIN, S. W.; SCHRYVER, H. F. Energy requirements of light horses for various activities. **Journal of Animal Science**, v. 32, p. 100-102, 1971b.
- HOFFMAN, R. M.; WILSON, J. A.; KRONFELD, D. S.; COOPER, W. L.; LAWRENCW, L. A.; SKLAN, D.; HARRIS, P. A. Hydrolysable carbohydrates in pasture, hay, and horses'

feeds: direct assay and seasonal variation. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 500-506, 2001.

ILSLEY, S. E.; MILLER, H. M.; GREATHEAD, H. M. R.; KAMEL, C. Plant extracts as supplements for lactating sows: effects on piglet performance, sow food intake and diet digestibility. **Animal Science**, v.77, p.247-254, 2003.

JONES, W.E. Nutraceuticals for equine practice. **J. Equine Vet. Sci.** v.17, p.562-572. 1997.

JOUANY, J. P.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 39-347, 2009.

JOUANY, J. P.; GOBERT, J.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or fight-starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 39-347, 2008.

JULLIAND, V.; FOMBELLE, A.; DROUGOUL, C.; JACOTOT, E. feeding and microbial disorders in horses: 3: effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 11, p. 543-546, 2001.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 626-631, 1994.

KIENZLE, E. Small intestinal digestion of starch in the horse. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 145 n. 3, p. 199-204, 1994.

KIRKPINAR, F.; ÜNLÜ, H. B.; ÖZDEMİR, G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. **Livestock Science**, v. 137, p. 219-225, 2011.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MÄRZ, R. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medicinal**, v. 66, p. 495–505, 2000.

KOLLER, B. L. Comparative cell wall and dry matter digestion in the cecum of the pony and rumen of the cow using in vitro and nylon bag techniques. **Journal Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 209-215, 1978.

LEWIS, D. L. **Alimentação e cuidados dos cavalos**. Fort Colling, Colorado: Colorado State University, 1985.

LEWIS, L. D. **Nutrição Clínica Equina**. São Paulo: Roca, 2000. v.1, p. 701.

LIMA, C.; F.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E. *descrever os demais autores*. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 457-465, 2004.

- LOWRY, G. F. Special unit and medical school laboratory technicians in New Zealand. A follow-up review and survey of training and qualifications 1970-1975. **New Zealand Medicine Journal**, v. 12, n. 5, p.579, 1977.
- MARCHELLO, E. V.; SCHURG, W. A.; MARCHELLO, J. A.; CUNEO, S. P. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n. 7 p. 453-458, 2000.
- MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine o horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2600-2609, 2002.
- MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 85-88, 1997.
- MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p.141-157.
- MEYER, H. **Alimentação de cavalos**. São Paulo: Varela, 1995. p. 303.
- MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.; FREMAUT, D.; DE SMET, S. DIERICK, N. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. **Livestock Science**.v.109, p.157-160, 2007.
- MOLERO, R.; IBARS, M.; CALSAMIGLIA, S. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 91-104, 2004.
- NCR. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of horse**. Washington, D.C., ed.6, p.341, 2007.
- NEWBOLD, C.; J.; McINTOSH, F.; M.; WILLIAMS, P. *descrever os demais autores* Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105-112, 2004.
- NOSTRO, A. Susceptibility of methicilin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol, and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 3, p. 191-195, 2004.
- OETTING, L. L.; UTIYAMA, C. E.; GIANI, P. A.; RUIZ, U. D. S.; MIYADA, V. S. Efeitos de extratos vegetais sobre a digestibilidade, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal dos leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.4, p.1389-1397, 2006.
- PASTORI, W. T.; RIBEIRO, R. M.; FAGUNDE, M. H. R.; PREZOTTO, L. D.; GOBESSO, A. A. O. Suplementação com óleo de soja na dieta de potros. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, n.9, p.1779-1784, 2009.

- PIVA, A.; CERVELLATI, C.; BIAGI, G. High dose of carvacrol, and not oregano, controls swine cecal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.80, p.395, 2002a.
- RADICKE, S.; MEYER, H.; KIENZLE, E. Investigations on blood glucose related to feeding type and feeding time in horses. **Pferdeheilkunde**, v. 10, p. 187, 1994.
- RALSTON, S. L.; BAILE, C. A. Plasma glucose and insulin concentrations and feeding behavior in ponies. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 6, p. 1132-1137, 1982.
- RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. College of Basic Sciences, Shahed University, **Food Control**, Tehran, Iran. v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.
- SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. 48 p. (Série Documentos, 20).
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. In: HELWIG, J. T.; COUNCIL, K. A. (Ed.). SAS: user's guide, Raleigh, NC: SAS Institute, Inc., 2004.
- SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, p. 29– 44, 1983.
- SCHNEIDER, B. H.; FLATT, W. P. **The evaluation of feeds through digestibility experiments**. Athens: University of Georgia Press, 1975. 423 p.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8022-8028, 1994.
- SILVA C. A., BRIDI A. M., GOMEZ R. J. H. C., SILVA C. R. B., MENEGUCCI C. G. & CARVALHO B. B. Uso de probiótico e de antibióticos na alimentação de leitões em fase de creche. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 28, p. 739-746, 2007
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 Ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002. 235 p.
- SILVA, J. P. L. descrever os demais autores Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis* **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 30 p. 136-141, 2010.
- SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999.
- SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAU, E.; NICOLAU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.
- STULL, C. L.; RODIEK, A. V. Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. **American Institute of Nutrition**. p. 206-213, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 13, p. 309-334.

TARAN, F. M. P. Avaliação do uso de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para equinos. 2011. 79f. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade São Paulo. São Paulo, 2011.

TEKIPPE, J. A.; HRISTOV, A. N.; HEYLER, K. S.; CASSIDY, T. W.; ZHELJAZKOV, V. D.; FERREIRA, J. F. S.; KARNATI, S. K.; VARGA, G. A. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.94, n.10, p. 5065-5079, 2011.

THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos cavalos**. São Paulo: Varela, 2005. v. 5.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 4, p. 399-403, 1989.

TREIBER, K. H.; BOSTON, R. C.; KRONFELD, D. S.; STANIAR, W. B.; HARRIS, P. A. Insulin resistance and compensation in Thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2357-2364, 2005.

TUCKER, L. A. Maintaining poultry performance in antibiotic-free diets supplementation with commercial botanical feed ingredients. In: WPSA ASIAN PACIFIC FEDERATION CONFERENCE, 7., 2002, Gold Coast, Australia. **Proceedings...** 2002. p. 227-230.

UDÉN, P.; VAN SOEST, P. J. Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fiber by ruminants, equine and rabbits. **British Journal of Nutrition**, v. 47, p. 267-272, 1982.

UDÉN, P.; VAN SOEST, P.J. Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fiber by ruminants, equine and rabbits. **British Journal of Nutrition**, v. 47, p. 267-272, 1982.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

UTIYAMA, C. E.; OETTING, L. L.; GIANI, P. A. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, frequência de diarréia e o desempenho de leitões recém- desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, 2006.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2. ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. p. 476.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological Reviews**. p. 395-411, 1992.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 145-154, 2003.

WATSON, T. D. G.; PACKARD, C. J.; SHEPERD, J. Plasma lipid transport in the horse (*Equus caballus*). **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 27-34, 1993.

WILKINSON, J. M.; HIPWELL, M.; RYAN, T.; CAVANAGH, H. M. A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 76– 81, 2003.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Immunoassay of plasma insulin in a man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 39, p. 1401, 1960.