**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

MAYARA ANGELA FAGA PALAGI

**Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura
Saccharomyces cerevisiae em dieta para equinos**

**Pirassununga
2015**

MAYARA ANGELA FAGA PALAGI

**Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em
dieta para equinos**

Pirassununga

2015

MAYARA ANGELA FAGA PALAGI

Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dieta para 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

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3230
FMVZ

Palagi, Mayara Angela Faga
Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dieta para equinos. / Mayara Angela Faga Palagi. -- 2015.
75 p. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

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

1. Digestibilidade. 2. Equinos. 3. Probióticos. 4. Resposta glicêmica. 5. Resposta insulinêmica.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dieta para equinos", protocolado sob o CEUA nº 2143091015, sob a responsabilidade de **Alexandre Augusto De Oliveira Gobesso e equipe; Mayara Angela Faga Palagi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em reunião de 28/10/2015.

We certify that the proposal "Evaluation of the use essential oils and *Saccharomyces cerevisiae* yeast in diet for horses", utilizing 8 Equines (8 males), protocol number CEUA 2143091015, under the responsibility of **Alexandre Augusto De Oliveira Gobesso and team; Mayara Angela Faga Palagi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/28/2015.

Vigência da Proposta: de 06/2013 a 10/2013

Área: Nutrição E Produção Animal

Procedência: Animais em vias de serem patrimoniados na FMVZ/USP, adquiridos com recursos FAPESP (Processo 2012/04161-4) sob responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso e alojados no Laboratório de Pesquisa em Alimentação e Fisiologia do Exercício de Equinos VNP/FMVZ/USP - Campus de Pirassununga

Espécie: Equídeo

Gênero: Machos

Idade: 48 meses

N: 8

Linhagem: Mini horse

Peso: 147 Kg

São Paulo, 31 de outubro de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PALAGI, Mayara Angela Faga

Título: Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dieta para 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. : _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho a minha
família e amigos pelo apoio,
compreensão e confiança nas
minhas escolhas. Obrigada a todos
por mais essa conquista.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todas as portas que foram abertas em minha vida, até mesmo as que foram fechadas, pois os obstáculos e negações que fizeram parte de minha trajetória até agora, com certeza trouxeram a maturidade de entender que tudo tem o tempo certo de acontecer.

A toda minha família, especialmente minha mãe Francisca, meu pai Valkil, irmã Vlamaira e namorado Felipe pelo apoio e compreensão dos meus sonhos, por estarem ao meu lado transformando momentos difíceis em simples etapas de vida.

As minhas amigas Ana Carolina, Maria Alice, Roberta, Kelly, Patrícia, Jackeline, Barbara, Talita e Ana Lia que estando perto ou distante sempre se fizeram presentes. Aqueles com quem convivi em Pirassununga morando, saindo e conversando, pelos inúmeros momentos alegres.

Ao professor Alexandre Gobesso pela oportunidade de ingressar no mestrado e conhecimento compartilhado, como também a todos os demais professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal que participaram de forma direta ou indireta do processo de construção dessa dissertação e fase de vida que se conclui.

Aos colegas de trabalho e amigos de vida, também conhecidos como labequianos, com quem tive a oportunidade de conviver ao longo desses últimos três anos, que me ensinaram que um trabalho nunca é desenvolvido sem uma equipe em que confiar e apoiar, com quem somos capazes de dar as mais espontâneas risadas, mas também passar pelas dificuldades de todos os dias. Quero que saibam que esse trabalho pertence tanto a mim quanto a vocês.

E por último, gostaria de agradecer ao meu filho que de forma inesperada me ensina que a vida é feita de recomeços e sonhos renovados, que nunca se trata de um fim, mas um ganho de maturidade e fortalecimento daquilo que mais nos importa na vida... A família e os amigos.

Obrigada a todos!!!!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

PALAGI, M. A. F. **Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dieta para equinos.** [Essential oils and *Saccharomyces cerevisiae* yeast evaluation in horses diet]. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com óleos essenciais e levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de equinos. Foi avaliada a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, resposta glicêmica e insulinêmica pós-prandial, 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), colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), pH fecal e população microbiana das fezes. Foram utilizados oito equinos da raça Mini-horse, machos, castrados, com idade de 48 ± 6 meses e peso inicial de 147 ± 15 kg, alimentados com dieta contendo 60% de concentrado comercial multiparticulado e 40% de feno de gramínea. Os tratamentos foram divididos em controle (sem adição de óleo essencial e levedura), levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* (2 g/dia de produto comercial com concentração de 20×10^9 UFC/g de levedura), óleos essenciais (150 mg/dia de composto comercial de óleos essenciais) e associação de *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais nas mesmas quantidades já mencionadas. 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%. Não foi observado efeito de tratamento ($P > 0,05$) para os diferentes coeficientes de digestibilidade de matéria seca (63,92%), matéria orgânica (66,70%), proteína bruta (82,78%), extrato etéreo (71,38%), amido (95,24%), fibra em detergente neutro (47,50%) e fibra em detergente ácido (36,40%). Na avaliação da Área abaixo da curva (AAC), não foi observado efeito de tratamento ($P > 0,05$) para glicose (579,75 mg/dL) e insulina (858,38 μ U/dL). Na avaliação de gordura plasmática não foi encontrado efeito de tratamento ($P > 0,05$) para triglicérides (43,79 mg/dL), colesterol total (111,21 mg/dL) e frações HDL (66,37 mg/dL), LDL (36,1 mg/dL) e VLDL (8,78 mg/dL). O valor de pH fecal observado (6,42) foi adequado para o equilíbrio da microbiota e não houve diferença entre os tratamentos ($P = 0,56$). Avaliando-se a população microbiana das fezes não foi possível observar efeito para *Fibrobacter succinogenes* ($P = 0,08$). Houve interação entre óleo e levedura para *Ruminococcus flavefaciens* ($P = 0,03$). Observou-se também efeito de levedura

para *Lactobacillus genus* ($P=0,04$). A inclusão de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de equinos não tem efeito sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes, resposta glicêmica e insulinêmica, perfil plasmático de triglicerídeos, colesterol e suas frações e pH fecal, porém a inclusão de levedura viva provoca alteração na população microbiana.

Palavras-chave: Digestibilidade. Equinos. Probióticos. Resposta glicêmica. Resposta insulinêmica.

ABSTRACT

PALAGI, M. A. F. **Essential oils and *Saccharomyces cerevisiae* yeast evaluation in horses diet**. [Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dieta para equinos]. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation of essential oils and live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the diet for horses. It was assessed apparent digestibility of nutrients, glucose and insulin postprandial responses, 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), fecal pH and microbial population in faeces. Eight horses were used, Mini-horse breed, geldings, aged 48 ± 6 months, initial weight 147 ± 15 kg, fed a diet containing high concentrate, consisting of 60% commercial concentrate and 40 % of grass hay. Treatments were divided in control (without essential oils and live yeast), live yeast *Saccharomyces cerevisiae* (2g/day of a commercial product with a concentration of 20×10^9 CFU/g of yeast), essential oils (150mg/day of a commercial product consisting of essential oils) and association of *Saccharomyces cerevisiae* with essential oils in the same quantity mentioned. The experimental design was 4x4 double Latin square with repeated measures over time and the data were subjected to analysis of variance with a significance level of 5%. It was not observed treatment effect ($P > 0.05$) for the different digestibility coefficients of dry matter (63.92%), organic matter (66.70%), crude protein (82.78%), ether extract (71.38%), starch (95.24%), neutral detergent fiber (47.50%) and acid detergent fiber (36.40%). In evaluation of the area under the curve (AUC), wasn't observed effects of treatment ($P > 0.05$) for values of glucose (579.75 mg/dL) and insulin (858.38 μ U/dL). In the evaluation of plasma lipids weren't found effect of treatment ($P > 0.05$) for values of triglyceride (43.79 mg/dL), total cholesterol (111.21 mg/dL) and fractions HDL (66.37 mg/dL), LDL (36.1 mg/dL) e VLDL (8.78 mg/dL). Fecal pH value (6.42) was found suitable to the balance of microorganisms, but there weren't effect of treatment ($P = 0.56$). In quantification of microbial population weren't observed effect for *Fibrobacter succinogenes* ($P = 0.08$), but were found effect for interaction of essential oils and live yeast for *Ruminococcus flavefaciens* ($P = 0.03$) and effect for *Lactobacillus* genus with the inclusion of yeast ($P = 0.04$). The inclusion of essential oil and live yeast has no effect on digestibility of

nutrients, glycemic and insulinemic response, plasma levels lipids and pH of faeces, however the inclusion of live yeast causes alteration in the microbial population.

Keywords: Digestibility. Glycemic response. Horse. Insulinemic response. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....	41
Figura 2 –	Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (PB), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....	42
Figura 3 –	Coeficientes de digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....	42
Figura 4 –	Coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo (EE), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....	43
Figura 5 –	Concentrações plasmáticas de triglicérides (mg/dL), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....	51
Figura 6 –	Concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL, LDL e VLDL (mg/dL), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....	53
Figura 7 –	População relativa de <i>Fibrobacter succinogenes</i> nos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais).....	57
Figura 8 –	População relativa de <i>Ruminococcus flavefaciens</i> nos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais).....	58
Figura 9 –	População relativa de <i>Lactobacillus genus</i> nos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais).....	58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Área abaixo da curva (AAC) para as concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais).....45
- Gráfico 2 – Concentração plasmática estimada e observada de glicose (mg/dL) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais).....46
- Gráfico 3 – Área abaixo da curva (AAC) para as concentrações plasmáticas de insulina (μ U/dL) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais).....49
- Gráfico 4 – Concentração plasmática estimada e observada de insulina (μ U/dL) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais).....50
- Gráfico 5 – Valores de pH fecal, em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição bromatológica do concentrado comercial utilizado na dieta experimental (100% de MS).....	33
Tabela 2 –	Composição bromatológica do feno Tifton 85 utilizado na dieta experimental (100% de MS).....	33
Tabela 3 –	Médias e erro padrão da média (EPM) para os diferentes coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais).....	40
Tabela 4 –	Médias e desvio padrão para as concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais), e tempo (-30, 30, 90, 150, 210 minutos).....	44
Tabela 5 –	Médias e desvio padrão para as concentrações plasmáticas de insulina (μ U/dL) de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais), e tempo (-30, 30, 90, 150, 210 minutos).....	47
Tabela 6 –	Área abaixo da curva (AAC) das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (concentração x tempo) de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais).....	48
Tabela 7 –	Médias e erro padrão da média (EPM) para a concentração plasmática de triglicérides (mg/dL), de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais).....	52
Tabela 8 –	Médias e erro padrão da média (EPM) para a concentração plasmática de colesterol total, HDL, LDL e VLDL (mg/dL), de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais).....	54
Tabela 9 –	Médias e erro padrão da média (EPM) para os valores de pH de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Área abaixo da curva
ATP	Adenosina tri fosfato
CD	Coeficiente de digestibilidade
CON	Controle
cv.	Cultivar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
HDL	Colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade
LDL	Colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade
LOS	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com óleo essencial
LSC	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
OES	Óleo essencial
PB	Proteína bruta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PV	Peso vivo
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
VLDL	Colesterol ligado à lipoproteína de muita baixa densidade
vs	Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
Ca^{+2}	Íon cálcio
cm	Centímetros
/	Divido
P	Fósforo
g	Grama
g/dia	Gramas por dia
° C	Graus Celsius
h	Horas
=	Igual
kg	Quilograma
+	Mais
$\pm$	Mais ou menos
<	Menor
-	Menos
m	Metros
mg	Miligramma
mg/dia	Miligramas por dia
ml	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
%	Porcentagem
Na^{+}	Íon sódio
$\mu\text{U/dL}$	micro unidade por decilitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA NUTRIÇÃO EQUINA	21
3.2	ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DOS EQUINOS.....	22
3.3	DIGESTIBILIDADE DOS CARBOIDRATOS	24
3.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	27
3.5	PROBIÓTICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	LOCAL	32
4.2	ANIMAIS	32
4.3	DIETAS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
4.4	VARIÁVEIS ANALISADAS	34
4.4.1	Digestibilidade aparente total	34
4.4.2	Glicose e Insulina	35
4.4.3	Gordura plasmática	36
4.4.4	pH fecal	36
4.4.5	População microbiana das fezes	36
4.5	ANÁLISES LABORATORIAIS	37
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS.....	38
5.1	DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES.....	39
5.2	GLICOSE E INSULINA	43
5.3	GORDURA PLASMÁTICA	51
5.3.1	Triglicérides.....	51
5.3.2	Colesterol total e frações ligadas à proteína	53
5.4	pH FECAL	55
5.5	POPULAÇÃO MICROBIANA DAS FEZES	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O rebanho mundial de equídeos atinge em torno de 590 milhões de cabeças, sendo que o brasileiro ocupa o quarto lugar com 7 milhões de animais, movimentando R\$7,3 bilhões na economia (LIMA; SHIROTA; BARROS, 2006), tornando o equilíbrio entre a nutrição, genética e manejo sanitário de extrema importância para a expressão do máximo potencial produtivo e econômico desses animais.

O equídeo apresenta trato digestório diferenciado em relação às demais espécies, que o classifica como herbívoro monogástrico com fenômenos de digestão no ceco e colón semelhantes aos poligástricos, o que o torna capaz de digerir alimentos distintos, desde substâncias concentradas como açúcares, amido, proteína ou gordura através da ação de enzimas próprias do estômago e intestino delgado, até material fibroso por meio da fermentação microbiana no intestino grosso, possibilitando a utilização dos carboidratos estruturais presentes nos alimentos volumosos como fonte de energia.

As pastagens de boa qualidade são capazes de atender as exigências nutricionais dos equinos em manutenção através da produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino grosso, mas não suprem as exigências energéticas de cavalos de alto desempenho, sendo necessário o uso de complementos, como grãos de cereais, como fonte primária de energia. Estes complementos contêm grandes quantidades de açúcares e amido, fornecendo mais energia que as forragens.

Os carboidratos são extremamente importantes na composição da dieta, chegando a constituir cerca de 75% da ração. No entanto, é necessário o equilíbrio entre os carboidratos estruturais e não estruturais, pois a ingestão de quantidades elevadas de amido podem não ser totalmente digeridas no intestino delgado, podendo chegar ao ceco e cólon, acarretando o aumento da produção de ácido lático e queda do pH, o que proporciona desequilíbrio da microbiota intestinal, e consequentemente, distúrbios gastrintestinais. Portanto, a variação sazonal das pastagens deve ser considerada na determinação da contribuição nutricional do pasto na alimentação dos equinos.

O pH e a taxa de renovação são fatores químicos e fisiológicos que atuam no crescimento microbiano e ambos são influenciados pela dieta e por outros fatores correlacionados como o nível de consumo, o manejo alimentar e a qualidade da forragem, além da relação volumoso/concentrado.

Com isso é crescente a busca por aditivos que mantenham uma microbiota adequada e pH intestinal estável, a fim de favorecer o desempenho animal e aproveitamento dos nutrientes presentes na dieta, sendo conhecidos como probióticos ou agentes antimicrobianos. Nesse aspecto, os óleos essenciais e levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* entram como alternativas de suplementos alimentares devido às propriedades antimicrobianas, inibidoras ou redutoras do crescimento de micro-organismos patógenos, associada à melhora das barreiras imunológicas no intestino regulando as atividades inflamatórias.

Contudo, a variação na quantidade e nas concentrações das cepas de levedura, na matéria-prima, no processamento utilizado na composição das dietas, raça, idade, proporção entre concentrado: volumoso, variedade de óleos essenciais e princípios ativos, as respostas obtidas no uso de tais produtos podem ser conflitantes, demonstrando que novos estudos são necessários para determinar sua viabilidade de uso, assim como, os reais benefícios à sanidade do animal.

2 OBJETIVO

Investigar o efeito da inclusão de um composto de óleos essenciais e levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de equinos, avaliando a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, resposta glicêmica e insulinêmica pós-prandial, 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), colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), pH fecal e população microbiana das fezes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA NUTRIÇÃO EQUINA

Conhecer o valor nutricional dos alimentos, assim como suas limitações, as exigências nutricionais nos diferentes períodos de vida do animal e o manejo alimentar é essencial para a formulação de uma dieta balanceada, que favoreça o desenvolvimento do potencial máximo que o cavalo possa vir apresentar (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), chegando a 3% no caso de animais em lactação ou crescimento, porcentagem esta associada à quantidade de fibra bruta na dieta (ANDRIGUETTO et al., 1984).

A fração volumosa da dieta é à base da nutrição equina por conter em sua composição grandes quantidades de fibra bruta, indispensável para saúde intestinal. Porém apenas seu fornecimento não supre as exigências energéticas necessárias para determinadas categorias, devido à baixa digestibilidade da parede celular da forragem (JOUANY et al., 2008; MEYER, 1995). Como consequência, os concentrados, em sua maioria grãos de cereais, foram incluídos na dieta, substituindo parte do fornecimento do volumoso, chegando a níveis de inclusão de até 80%. Os concentrados são alimentos que fornecem uma alta concentração de energia alimentar, possuindo uma baixa quantidade de fibra bruta.

Porém, o equilíbrio entre essas duas fontes energéticas deve ser levado em consideração, uma vez que o cavalo como um animal herbívoro necessita ingerir um teor de fibra de 16 a 18% para manutenção da microbiota intestinal, evitando distúrbios gastrintestinais. É recomendado que os alimentos concentrados sejam fornecidos em, pelo menos, três refeições ao dia, acompanhados por um volumoso de boa qualidade (ANDRIGUETTO et al., 1984; MEYER, 1995).

3.2 ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DOS EQUINOS

Os equinos apresentam características anatômicas e fisiológicas no trato gastrointestinal peculiares em relação a outras espécies domésticas, que o classificam como herbívoro monogástrico com 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. O processo de digestão é constituído por diferentes fases: a fase cefálica, mediada pelo nervo vago em razão do olfato e paladar; a fase gástrica, caracterizada pela distensão do estômago e processos químicos; e a fase entérica, iniciada com a passagem do alimento ao intestino delgado (THOMASSIAN, 2005).

A motilidade gastroentérica é classificada em movimento segmentar que proporciona a homogeneização da digesta e movimento propulsivo ou progressivo que se encarrega de transportar os alimentos aos diversos segmentos que compõem o trato gastrointestinal, sendo que o tempo de permanência do alimento nos mesmos depende de múltiplos fatores, tais como características individuais do animal, granulometria das partículas, digestibilidade, pureza dos alimentos, frequência da alimentação, tipo de exercício, ingredientes da dieta, temperatura ambiente e teor de fibra da ração (MEYER, 1995).

A apreensão dos alimentos efetua-se com o auxílio dos lábios, língua e dentes, sendo necessária para a mastigação uma dentição completa e sem anomalias. O tempo de mastigação depende da natureza do alimento, sendo mais rápido para alimentos concentrados do que volumosos. Esse processo é acompanhado por uma produção abundante de saliva (40-90 ml/min) que possibilita a deglutição, umedecendo o alimento com minerais e bicarbonato que neutralizam os ácidos formados na porção inicial do estômago. A saliva contém amilases em baixa quantidade e enzimas envolvidas na quebra de carboidratos e outros nutrientes, como proteínas e açúcares, que posteriormente serão digeridos no estômago e intestino delgado (CUNHA, 1991; MEYER, 1995).

O estômago, com capacidade de 15 a 18 litros, recebe continuamente pequenas quantidades de alimento, realizando uma degradação parcial dos mesmos. Seu processo digestivo é concretizado através da atividade de enzimas alimentares, micro-organismos e suco gástrico (LEWIS, 2000; THOMASSIAN, 2005).

De acordo com Cunha (1991), o tempo de passagem do alimento do estômago para o intestino delgado é rápido, o que torna a degradação do amido e açúcares restringida pelo reduzido tempo de ação dos micro-organismos, associado ao baixo pH que desfavorece a ação das bactérias.

O intestino delgado é subdividido em duodeno, jejuno e íleo, formado por mucosas musculosas, rígidas e ricamente enervadas, que geram fortes ondas de contração promovendo a progressão da digesta. A mucosa duodenal possui glândulas que secretam o suco entérico e grande quantidade de muco. Suas inúmeras vilosidades revestidas de células epiteliais cilíndricas com microvilosidades aumentam a superfície de absorção dos nutrientes, o que o torna o principal local de digestão e absorção de carboidratos solúveis, gorduras, proteínas, vitaminas e minerais (LEWIS, 2000; MEYER, 1995; THOMASSIAN, 2005).

O intestino grosso é composto pelo ceco, cólon ventral direito, flexura externa para cólon ventral esquerdo, flexura pélvica para cólon dorsal esquerdo, flexura diafragmática para cólon dorsal direito, cólon menor e reto (MEYER, 1995). De acordo com Hintz et al. (1971), esse compartimento é o principal local para digestão dos carboidratos estruturais por enzimas produzidas pelos micro-organismos, para posteriormente serem absorvidos na forma de ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato.

Segundo Drogoul, Poncet e Tisserland (2000) existem dois fenômenos de retenção seletiva no intestino grosso, sendo que um deles ocorre no ceco e cólon ventral com retenção de partículas grosseiras, e o outro no cólon dorsal e distal relacionado a retenção de líquido e partículas pequenas com tamanho inferior a 2 mm. Esse mecanismo ocorre porque as contrações musculares da parede do cólon distal impulsionam o líquido em movimento retrogressivo 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.

O ceco é a principal porção do intestino grosso para fermentação da fibra através de uma microbiota composta de protozoários e bactérias. No entanto, como a digestão e absorção dos carboidratos solúveis e proteína ocorrem antes do intestino grosso, pouco material além do fibroso atinge o ceco dos equinos, o que pode prejudicar a população de micro-organismos, diminuindo o aproveitamento de tais nutrientes (THOMASSIAN, 2005; UDÉN; VAN SOEST, 1982).

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, que 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).

3.3 DIGESTIBILIDADE DOS CARBOIDRATOS

O termo digestibilidade é aplicado à parcela do alimento digerida e não excretada nas fezes, sendo considerada aparente, pois o material excretado não é originado somente do alimento, mas também de células que compõe o trato gastrointestinal e secreções digestivas (NRC, 2007).

Os carboidratos são avaliados nas dietas em função das características anatômicas dos vegetais, com ênfase na parede celular vegetal e conteúdo celular. Segundo Van Soest (1994), são classificados em estruturais, constituídos por polissacarídeos presentes na parede celular, como hemicelulose, celulose e lignina, e não estruturais formados por carboidratos simples como o amido, monossacarídeos, dissacarídeos, frutanos e pectinas.

Hoffman et al. (2001) propõe uma classificação para os carboidratos que os divide em: carboidratos-hidrolisáveis que inclui monossacarídeos, dissacarídeos e amido que serão hidrolisados à açúcares simples no intestino delgado; e carboidratos fermentáveis no intestino grosso que irão produzir ácidos graxos de cadeia curta. Estes são subdivididos em uma fração rapidamente fermentável representada por oligossacarídeos, frutanos, galactanos, β -glucanos e substâncias pécicas, e outra fração lentamente fermentável na qual são incluídas a hemicelulose e celulose. Através desse sistema, é possível uma melhor avaliação do valor da energia que compõe os carboidratos na alimentação como componentes separados que são absorvidos como glicose, daqueles que são fermentados como ácidos graxos de cadeia curta.

De acordo com Hintz et al. (1971), dietas ricas em grãos tendem a ter uma maior digestão de carboidratos no intestino delgado e maior absorção de glicose, enquanto uma dieta exclusiva de forragens estimula maior conversão de carboidratos para ácidos graxos de cadeia curta por bactérias no ceco e cólon.

A fibra é constituída por celulose, hemicelulose e lignina formando a parede celular dos vegetais, não é digerida pelas enzimas digestivas, mas é susceptível a degradação pelos micro-organismos intestinais. Seu aproveitamento pelos equinos esta associado a diversos fatores como a composição da dieta, especialmente relacionada com a proporção entre

volumoso e concentrado, taxa de fermentação microbiana, taxa de passagem da digesta pelo trato digestório, sendo que o aumento da sua digestibilidade geralmente acompanha o maior tempo de retenção da digesta no trato gastrointestinal, taxa de excreção endógena, alterações no bolo alimentar, capacidade de retenção de água na digesta e pH (DROGOUL; FOMBELLE; JULLIAND, 2001; VAN SOEST, 1994). Os cavalos digerem as fibras com 60 a 70% menos eficiência que os ruminantes por apresentarem taxa de passagem da digesta mais rápida, o que reduz a exposição do alimento à ação microbiana no intestino grosso (HINTZ et al., 1971; UDÉN; VAN SOEST, 1982).

A concentração de ácidos graxos de cadeia curta é determinada no ceco, de acordo com a proporção entre concentrado e volumoso, e satisfaz em grande parte a necessidade energética de manutenção principalmente através do acetato, além de butirato e propionato, sendo este usado para síntese de glicose hepática. Porém, para atingir a necessidade energética de cavalos em atividade se torna insuficiente, sendo necessária a adição de grãos de cereais e/ou seus coprodutos com quantidades elevadas de amido, o que fornece mais energia do que as forragens e estabelece altas respostas glicêmicas. No entanto o excesso de carboidratos hidrolisáveis e de rápida fermentação ocasiona alterações na microbiota intestinal, proporcionando uma queda na produção de acetato, redução do pH e aumento na proporção de ácidos propiônico e láctico (MEYER, 1995; KRONFELD et al., 2004; NRC, 2007).

De acordo com Arai et al. (1994), a glicose é a maior fonte de energia para animais e a glicólise é a melhor reação enzimática para a produção de ATP nas células. O transporte de glicose no interior das células é o primeiro passo para sua utilização. Sendo assim, Forhead et al. (1994) afirmam que a insulina é de fundamental importância para a regulação dos processos metabólicos glicoregulatórios. Rankin (1997) sugere que para completar a avaliação do índice glicêmico de um alimento, ou seja, a magnitude da resposta em glicose plasmática após sua ingestão, a concentração plasmática de insulina pode ser um bom indicativo da presença de açúcar na corrente sanguínea. Neste sentido, Glade, Gupa e Reimers (1984) informam que uma rápida resposta secretora de insulina pelo pâncreas pode estar associada com a ingestão de grandes quantidades de energia e proteína.

A digestão do amido é influenciada pela forma física do alimento, granulação, recristalização, inibidores da alfa-amilase, mastigação, tempo de trânsito gastrointestinal, concentração de alfa-amilase no intestino, quantidade de amido ingerida e presença de outros constituintes alimentares que retardam a hidrólise enzimática (ENGLYST; HAY; MACFARLANE, 1987).

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. A glicose formada é então cotransportada para o interior dos enterócitos com o auxílio do íon 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, variando de 87 a 100%, existe uma porção indigestível em sua estrutura que resiste à ação da alfa-amilase pancreática, enzima esta de baixa atividade em equinos, o que compromete a digestão pré-cecal do mesmo em dietas com altas quantidades de amido ou fontes estruturalmente complexas deste nutriente (KIENZLE, 1994).

Medina et al. (2002) relataram que cavalos alimentados com dieta de alta concentração de amido apresentaram aumento na concentração total de bactérias anaeróbicas *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.*, aumento na utilização de ácido láctico e nas concentrações de propionato, diminuição do pH cecal, do número de bactérias celulolíticas e da concentração de acetato.

Julliand et al. (2001) avaliaram o efeito na atividade microbiana da inclusão de três diferentes proporções de volumoso:concentrado (100:0, 70:30 e 50:50) com aumento gradativo de cevada na dieta e constataram que houve redução no pH do ceco e cólon, com diferenças significativas entre os tratamentos 100:0 e 50:50, devido ao aumento do lactato proveniente de uma maior atividade das bactérias amilolíticas (*Lactobacillus e Streptococcus*) e queda na concentração de bactérias celulolíticas.

Drogoul, Fombelle e Julliand (2001) justificam que o aumento dos níveis de concentrado na dieta eleva a passagem do mesmo do intestino delgado para o ceco, o que resulta em maior quantidade de carboidratos não estruturais no intestino grosso e consequentemente mudanças na microbiota.

Quando os carboidratos não estruturais como o amido, monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos 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 6, aumentando o risco de desordens digestivas como diarreia

osmótica e cólica associadas à distensão intestinal por gases e fluidos (COHEN; GIBBS; WOODS, 1999).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

O Brasil é um grande produtor de ervas aromáticas e condimentos empregados na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosmético, com as finalidades de conferir sabor e aroma diferenciados, assim como tratamento e cura de enfermidades. É possível encontrar nas regiões mais pobres do país e grandes cidades, plantas medicinais comercializadas em feiras livres, mercados populares e quintais de residências (REHDER et al., 2004).

É crescente o número de consumidores que exigem da indústria de alimentos a adoção de uma política que minimize o uso de aditivos químicos, com base na toxicidade ou suspeita dela, para obtenção de segurança alimentar e retardo das ações microbianas de caráter deteriorante, que conduzem o alimento a um estado impróprio para o consumo. Seguindo esta tendência, aspectos legislativos que envolvem a produção de alimentos têm demandado uma diminuição na utilização de tais aditivos químicos pela indústria (GORDON, 1996). Neste contexto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas pela busca de compostos alternativos viáveis, para um emprego racional como conservantes naturais na produção de alimentos, o que torna o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentar efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (CHAO; YANG, 2000).

Os produtos de origem vegetal surgem como uma alternativa aos aditivos químicos, mas também aos compostos antimicrobianos, uma vez que cepas microbianas resistentes a esses compostos têm aparecido devido ao seu uso excessivo. Tal fato motivou a busca por extratos de vegetais que promovam a manutenção e equilíbrio da microbiota, assim como apresentem ação antioxidante, sendo fontes ricas em tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos (ANDREMONT, 2001).

As especiarias e os produtos derivados de plantas (extratos, óleos essenciais, constituintes químicos) têm mostrado resultados satisfatórios na inibição de micro-organismos patógenos oportunistas, patógenos primários, deteriorantes e/ou ação na inibição da produção de toxinas microbianas (KIZIL; SOGUT, 2003).

Conforme Cosentino et al. (1999), são chamados de óleos essenciais os constituintes odoríferos ou essências de uma planta. O termo “óleo”, provavelmente se origina do fato de que o aroma de uma planta se encontra nas glândulas ou entre as células em forma líquida e que como os ácidos graxos, são imiscíveis em água. A palavra essencial é derivada do latim “quinta essência” que significava o quinto elemento, notação dada a esses óleos, uma vez que a terra, o fogo, o ar e a água foram considerados os quatro primeiros elementos (MARINO; BERSANI; COMI, 2001).

Tais compostos são extraídos das plantas por processos específicos, sendo os mais frequentes a destilação por arraste de vapor d’água ou processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (CHAO; YANG, 2000). Sua principal característica é possuir uma notável atividade antimicrobiana, retardando ou inibindo o crescimento de micro-organismos patógenos e/ou deteriorantes (MELO, 2003). De maneira geral, são uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois e aromáticos encontrados em todo tecido vivo das plantas, concentrados na casca, nas flores, nas folhas, nos rizomas e nas sementes (MARINO; BERSANI; COMI, 2001).

Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, tendo como principal característica a volatilidade, o que 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).

Vários são os óleos essenciais com potencial de comercialização e funcionalidade conhecida, 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*) (VELLUTI; SANCHIS; RAMOS, 2003).

O efeito dos óleos essenciais sobre as bactérias depende de uma série de fatores, dentre eles, a forma e a época de coleta da planta que pode influenciar na composição dos constituintes que irão atuar sobre as bactérias e micro-organismos que se deseja combater (SILVA et al., 2010). Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nesses óleos, é provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, estando ligada ao princípio ativo que o compõe de forma majoritária. Os principais compostos orgânicos encontrados nos óleos essenciais e que

lhes confere função são o hidrocarboneto, álcool, aldeído, cetona, éster, éter e fenol, sendo seus mecanismos de ação, em sua maioria, associados à membrana celular influenciando o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzima-dependentes (CALSAMIGLIA et al., 2007; DORMAN; DEANS, 2000).

Uma característica importante desses óleos é a hidrofobicidade que permite a partição dos lipídios na membrana celular bacteriana e mitocôndrias, desestabilizando as estruturas celulares. Isto ocorre quando o óleo encontra-se sob forma indissociada (mais hidrofóbica), que está diretamente relacionada à ação antimicrobiana (CALSAMIGLIA et al., 2007). Essa 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 (LAMBERT et al., 2001).

Estudos corroboram 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).

Óleos essenciais mostraram ter atividade contra muitas espécies de bactérias: *Aromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Clotridium 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; UYTENDAELE; DEBEVERE, 2003).

O extravasamento de íons é outro possível mecanismo, uma vez que 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, a liberação excessiva de íons e moléculas vitais pode levar a morte celular (ULTEE; KETS; SMID, 1999).

Outros mecanismos de ação também já foram verificados. Alguns compostos como os fenóis, parecem atuar nas proteínas da membrana citoplasmática 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).

Adicionalmente, os óleos essenciais conseguem atuar em enzimas envolvidas nos processos de regulação de energia e de síntese de componentes estruturais. Como exemplo, o óleo de canela e seus componentes foram eficientes em inibir as enzimas aminoácido-descarboxilases da bactéria *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 seja o responsável por se ligar às proteínas, inibindo a ação das aminoácido-descarboxilases. Também já se demonstrou que o eugenol inibiu a produção de amilases e proteases da bactéria *Bacillus cereus* (THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989).

3.5 PROBIÓTICOS

O conceito de probiótico foi relatado pela primeira vez em 1907 por Elie Metchnikoff através da observação de que o consumo de leite fermentado, por um grupo étnico específico, teria sido responsável pela maior longevidade do mesmo, sugerindo que estes produtos manipulavam a microbiota intestinal, o que auxiliava no equilíbrio das bactérias patogênicas e não patogênicas (WEESE et al., 2003). No entanto, o termo probiótico foi proposto pela primeira vez em 1965 por Lilley e Still Well para descrever substâncias secretadas por um organismo que favorecem o crescimento de outro, sendo contrário ao antibiótico.

Fuller (1989) conceituou como probiótico a suplementação com micro-organismos vivos na alimentação que beneficia o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal. Atualmente é aceito que os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (GIRARDIN; SEIDMAN, 2011).

A estabilização da microbiota no intestino ajuda o animal a resistir a infecções, particularmente do trato gastrointestinal, sendo que ela começa a ser formada quando o feto passa pela vagina da mãe, adquirindo micro-organismos específicos para cada espécie. Porém, esse equilíbrio pode ser influenciado pela dieta e fatores ambientais como excesso de higiene, uso de antibióticos terapêuticos e estresse (FULLER, 1989).

Com o conhecimento dos benefícios proporcionados pelos micro-organismos vivos intestinais foi intensificada a utilização de antibióticos terapêuticos como promotores de

crescimento na produção animal, acarretando no desenvolvimento de resistência pelas bactérias e preocupação com os possíveis efeitos colaterais causados. Com isso, novas possibilidades passaram a ser estudadas e o uso dos probióticos se tornou uma excelente alternativa devido a suas propriedades, que incluem: a habilidade em reduzir o uso de antibióticos, o alto índice e segurança aparente, positiva percepção pelo público como “terapia alternativa” e/ou “natural”, manutenção da microbiota intestinal e melhora nas barreiras imunológicas no intestino através do balanceamento entre as atividades pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (WEESE et al., 2003; CHAUCHEYRAS-DURAND; DURAND, 2010).

O sucesso na adesão de tais probióticos no trato gastrointestinal depende de diversos fatores que lhes permite resistir aos mecanismos antimicrobianos presentes no intestino, estando eles relacionados com a capacidade de se manter no trânsito intestinal, resistindo à ação enzimática, habilidade em aderir-se às células epiteliais do intestino a fim de colonizá-lo, apresentar taxa de crescimento superior a sua eliminação pelo peristaltismo intestinal junto com o alimento, produzir fatores antimicrobianos e inibir patógenos entéricos (FULLER, 1989; WEESE, 2001).

Vários micro-organismos são usados como probióticos a fim de proporcionar enzimas digestivas e tentar estabelecer um equilíbrio desejável dos organismos intestinais, sendo os mais comuns pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, além das leveduras vivas como a *Saccharomyces cerevisiae* (OITICICA, 2007).

Os possíveis mecanismos de ação de tais aditivos estão principalmente relacionados com a produção de componentes antibacterianos, competição por nutrientes e/ou competição por sítios de ligação, alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou redução da atividade enzimática e simulação de imunidade pelo aumento do nível de anticorpos ou da atividade macrófaga (FULLER, 1989).

Muitos fatores influenciam os resultados obtidos com uso dos probióticos, sendo a dieta apenas um deles, uma vez que o efeito estimulante de crescimento é variável e ocorre em animais afetados pela depressão do desenvolvimento da microbiota, além de depender da adequada concentração de micro-organismos viáveis a serem manipulados na preparação dos mesmos. As variabilidades dos resultados das pesquisas realizadas podem ainda estar associadas com as diferentes cepas, nível de dose, condição de armazenamento, estratégia de alimentação e interações com drogas (FULLER, 1989), o que mostra a necessidade de novos estudos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Alimentação e Fisiologia do Exercício em Equinos (LabEqui) pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), situado no Campus Fernando Costa da cidade de Pirassununga / SP.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados oito pôneis da raça Mini-Horse, machos, castrados com idade de 48 ± 6 meses e peso inicial de 147 ± 15 kg, previamente imunizados contra tétano, vermifugados e pulverizados contra ectoparasitas.

4.3 DIETAS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizada dieta constituída de 60% de concentrado comercial multiparticulado¹ e 40% de feno Tifton 85 (*Cynodon sp*), com inclusão de 150 mg/dia de um composto comercial de óleos essenciais² constituído de timol, guaiacol, m-cresol e eugenol, e 2 g/dia de um produto comercial contendo 20×10^9 UFC/g de levedura viva *Saccharomyces cerevisiae*³ (CNCM I-1077). Água foi fornecida *ad libitum*.

¹ Corcel Mix – Presence/ In Vivo, Nutrição e Saúde Animal

² CRINA Horse, DSM Nutricional Products Ltd., Basileia, Suíça

³ LEVUCCELL SC, Lallemand Animal Nutrition, Canadá

A composição bromatológica do concentrado comercial multiparticulado e do volumoso utilizado na dieta, está descrita nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Composição bromatológica do concentrado comercial utilizado na dieta experimental (100% de MS)

Nutrientes (%)	Concentrado
Matéria seca (MS)	89,48
Proteína bruta (PB)	20,03
Fibra em detergente neutro (FDN)	25,65
Fibra em detergente ácido (FDA)	11,15
Matéria mineral (MM)	9,16
Extrato etéreo (EE)	3,81
Cálcio (Ca)	1,41
Fósforo (P)	0,74
Amido	24,25

Fonte: Palagi (2015)

Tabela 2 - Composição bromatológica do feno Tifton 85 utilizado na dieta experimental (100% de MS)

Nutrientes (%)	Volumoso
Matéria seca (MS)	92,62
Proteína bruta (PB)	9,16
Fibra em detergente neutro (FDN)	76,14
Fibra em detergente ácido (FDA)	41,29
Matéria mineral (MM)	6,26
Extrato etéreo (EE)	1,94
Cálcio (Ca)	0,36
Fósforo (P)	0,22
Amido	1,54

Fonte: Palagi (2015)

A dieta total (volumoso + concentrado) foi dividida em duas partes iguais, fornecidas às 7h e às 19h. O concentrado e volumoso foram fornecidos simultaneamente, em comedouros separados, conforme modelo proposto por Carvalho (1992). O consumo diário

individual adotado foi equivalente a 1,75% do peso vivo em matéria seca (MARTIN-ROSSET, 2012).

Os tratamentos foram divididos em controle (CON) (sem adição de óleos essenciais e levedura), levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* (LSC) (2g/dia), óleos essenciais (OES) (150mg/dia) e associação de *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais (LOS) nas mesmas quantidades já mencionadas.

Para facilitar a adição diária dos suplementos na dieta os tratamentos (óleos essenciais e levedura) foram misturados em 10g de farinha de milho, utilizando-se homogeneizador tipo “Y”, e fornecidos junto ao concentrado somente na refeição da manhã.

4.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

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

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

As amostras dos alimentos fornecidos foram retiradas a cada período experimental, formando uma amostra composta que foi acondicionada em sacos plásticos e armazenada a -20°C para posterior análise bromatológica.

4.4.1 Digestibilidade aparente total

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta foram estimados através do método da coleta total de fezes, realizado em período de 5 dias, as fezes recolhidas

foram acondicionadas em sacolas plásticas, pesadas a cada 24h, identificadas por animal e armazenadas a -20°C.

Ao final de cada período de coleta, as amostras de fezes totais foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas manualmente e retirada uma alíquota de 10% do total que foi armazenado para cada animal. Posteriormente as fezes, assim como a amostra composta dos alimentos, foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a 65° C. Logo após, foram moídas em moinhos com peneira de crivos de 1 mm. Todas as amostras, após serem moídas, foram acondicionadas em saquinhos plásticos e identificadas para posterior análise bromatológica.

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

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

4.4.2 Glicose e Insulina

As análises para as 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, 90, 150 e 210 minutos após o fornecimento da dieta do período da manhã (STULL; RODIEK, 1988). As amostras foram centrifugadas para separação do plasma e acondicionadas em tubos eppendorfs de 2 ml a -20°C.

4.4.3 Gordura plasmática

Para análise de colesterol total e suas frações HDL, LDL e VLDL, e triglicérides foram colhidas amostras sanguíneas no primeiro dia de cada fase de coleta de fezes, antes da primeira refeição matutina, como sugerido por Marchello et al. (2000). As colheitas foram realizadas através de venopunção da veia jugular, em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante e com capacidade para 5ml, posteriormente foram centrifugadas e o soro acondicionado em tubos eppendorfs de 2ml a -20°C.

4.4.4 pH fecal

Foi aferida a curva de pH fecal no segundo dia de coleta de fezes, sendo estabelecidas 4 faixas de horários para coleta das amostras (07-10h, 10-13h, 13-16h e 16-19h), nas quais cada faixa representou 3 h, totalizando 12h de coleta. As amostras de fezes para mensuração do pH foram coletadas nos momentos de defecação espontânea (50g) e acrescidas de 50ml de água destilada, para então serem submetidas a leitura do pHmetro de bancada (Quimis), e posteriormente, enquadradas na faixa de horário correspondente (BERG et al., 2005).

4.4.5 População microbiana das fezes

Para quantificação do DNA bacteriano presente nas fezes, 50g de fezes de cada animal foram coletadas em momentos de defecação espontânea no último dia de cada fase de coleta total, após a refeição da manhã, em tubos tipo Falcon, esterilizados, para serem acondicionadas a -80°C. Posteriormente, foi feito o processamento da amostra, extração, identificação e quantificação do DNA por meio da PCR em tempo real, usando primers específicos para as bactérias *Fibrobacter succinogenes*, *Lactobacillus genus* e *Ruminococcus flavefaciens* (CHEN et al., 2004).

4.5 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).

A análise de cálcio (Ca) foi realizada pelo método de titulometria com EDTA e para análise de fósforo (P) foi utilizado o método colorimétrico (AOAC, 2010).

A análise do amido foi conduzida segundo o método enzimático descrito por Pereira e Rossi Junior (1988).

Para dosagem de glicose foi utilizado o método enzimático descrito por Bergmeyer (1975) e Tonkk (1972), e para dosagem de insulina plasmática a técnica de quimiluminescência, descrita por Howanitz, Howanitz e Henry (1991).

O perfil de gordura plasmática, que corresponde à mensuração 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), que foram determinados pelo método enzimático através do equipamento automático Mindray BS120. Para a obtenção dos valores de LDL e VLDL foram utilizados cálculos matemáticos, segundo Equação de Freidewald, Levy e Fredrickson (1972), sendo elas:

$$\text{LDL} = \text{colesterol total} - \text{HDL} - \text{Triglicérides}/5$$

$$\text{VLDL} = \text{Triglicérides}/5$$

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo 4x4 (oito animais, quatro tratamentos) com medidas repetidas no tempo. Os resultados de digestibilidade, pH fecal, glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e frações de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) e PCR foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo pelo procedimento PROC MIXED do SAS, versão 9.2 (2004), considerando uma significância de 5% ($P < 0,05$) e 10% ($P < 0,1$). Anteriormente verificou-se a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo Proc Univariate.

Realizou-se a apresentação de contrastes conforme proposto pelo estudo, sendo eles controle vs demais, óleo e levedura vs óleo + levedura e óleo vs levedura. O modelo incluiu efeitos fixos de tratamento e período e efeito aleatório de animal. Para as análises de glicose e insulina, foram acrescentados como efeitos aleatórios animal dentro de quadrado e interação tratamento x tempo.

Os níveis plasmáticos de glicose e insulina foram analisados pela área abaixo da curva (AAC) e regressão clássica dos tratamentos ao longo do tempo pelo PROC MIXED.

5 RESULTADOS

A dieta fornecida aos equinos durante todos os períodos do experimento demonstrou ser adequada para manutenção da higidez, não sendo observada alteração de peso significativa, assim como alterações de consistência e aspecto das fezes, inerentes a mesma, ou aos tratamentos utilizados. O ganho de peso médio dos pôneis durante o experimento foi de $6,38 \pm 4,69$ Kg.

5.1 DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES

Os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e amido estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os diferentes coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Variáveis	Tratamentos			EPM	Contrastes (valores de P)		
	CON	LSC	OES		CON x demais	OES e LSC x LSC + OES	OES x LSC
(%)							
MS	62,42	63,63	65,50	1,40	0,20	0,78	0,32
MO	65,19	67,18	67,86	1,38	0,16	0,53	0,69
PB	82,97	82,45	83,60	1,16	0,80	0,39	0,35
EE	69,77	75,26	70,95	4,96	0,64	0,47	0,45
FDN	45,96	48,96	47,92	2,25	0,39	0,60	0,72
FDA	35,19	36,72	37,71	2,53	0,55	0,67	0,76
AMIDO	94,36	96,53	94,87	0,84	0,22	0,62	0,16

Fonte: Palagi (2015)

S: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido
CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais
Valores de P para cada contraste proposto (controle vs. demais, óleos essenciais e levedura vs. levedura com óleos essenciais e levedura vs. levedura)

Os tratamentos não influenciaram nos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca ($P=0,44$) e matéria orgânica ($P= 0,45$) como apresentado na figura 1.

Figura 1 – Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Os tratamentos não influenciaram nos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta ($P= 0,63$) como apresentado na figura 2.

Figura 2 – Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (PB), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Os tratamentos não influenciaram nos coeficientes de digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro ($P= 0,75$) e fibra em detergente ácido ($P= 0,88$) como apresentado na figura 3.

Figura 3 – Coeficientes de digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), em função dos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Não houve efeito de tratamento para o coeficiente de digestibilidade aparente de extrato etéreo (P= 0,71) como apresentado na figura 4.

Figura 4 – Coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo (EE), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

5.2 GLICOSE E INSULINA

Os valores encontrados para resposta glicêmica estão dentro dos parâmetros de referência preconizados (75-115 mg/dL), onde a glicemia em jejum varia entre 80 a 100mg/dL, e após refeições ricas em amido, pode elevar-se a 150 mg/dL no prazo de 2-3 horas (MEYER, 1995).

As médias e os desvios padrões das concentrações plasmáticas de glicose nos diferentes tempos estão apresentados na tabela 4. No presente estudo não foi observado efeito de interação tratamento x tempo (P= 0,99) ou entre os tratamentos (P= 0,93) (Tabela 6). A área abaixo da curva esta representada no gráfico 1.

As concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) em relação ao tempo estão representadas no gráfico 2.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão para as concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais), e tempo (-30, 30, 90, 150, 210 minutos)

Tratamentos	Tempo				
	-30	30	90	150	210
CON	87,51±4,87	103,66±7,85	128,56±22,65	123,86±29,93	113,46±33,23
LSC	85,68±6,49	103,43±12,39	126,02±23,40	128,27±28,49	122,47±28,93
OES	85,6±7,24	107,67±7,18	128,81±25,79	124,38±21,57	116,91±15,92
LOS	85,3±3,80	104,63±11,34	118,3±23,10	121,31±26,02	123,05±23,37

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Gráfico 1 – Área abaixo da curva (AAC) para as concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Gráfico 2 – Concentração plasmática estimada e observada de glicose (mg/dL) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CT obs.: levedura observada; lev. obs.: levedura observada; óleo obs.: óleo essencial observado; lev. + óleo obs.: levedura com óleo observado

CT est.: controle estimado; lev. est.: levedura estimado; óleo est.: óleo essencial estimado; lev. + óleo est.: levedura com óleo estimado

As médias e os desvios padrões das concentrações plasmáticas de insulina nos diferentes tempos estão apresentados na tabela 6. No presente estudo não foi observado efeito de interação tratamento x tempo ($P= 1,00$) ou entre os tratamentos ($P= 0,78$) (Tabela 7). A área abaixo da curva esta representada no gráfico 3.

As concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/dL}$) em relação ao tempo estão representadas no gráfico 4.

Tabela 5 - Médias e desvio padrão para as concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/dL}$) de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais), e tempo (-30, 30, 90, 150, 210 minutos)

Tratamentos	Tempo				
	-30	30	90	150	210
COM	24,93 $\pm$ 17,34	82,11 $\pm$ 37,59	170,36 $\pm$ 115,25	172,86 $\pm$ 112,94	185,61 $\pm$ 118,75
LSC	28,86 $\pm$ 21,81	90,83 $\pm$ 46,77	213,57 $\pm$ 106,78	226,42 $\pm$ 106	208,96 $\pm$ 107,67
OES	24,98 $\pm$ 18,66	101,03 $\pm$ 65,65	196,16 $\pm$ 103,01	222,77 $\pm$ 107,14	221,17 $\pm$ 109,24
LOS	32,67 $\pm$ 36,27	95,41 $\pm$ 43,23	198,98 $\pm$ 114,74	217,58 $\pm$ 108,86	221,17 $\pm$ 111,81

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Tabela 6 - Área abaixo da curva (AAC) das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (concentração x tempo), de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais)

Variáveis (conctxtempo)	Tratamentos				EPM	Contrastes (valores de P)		
	CON	LSC	OES	LSC + OES		CON x demais	OES e LSC x OES + LSC	OES + LSC
Glicose	576,75	586,69	577,73	577,83	30,18	0,91	0,91	0,84
Insulina	775,94	885,58	876,12	895,91	91,24	0,31	0,89	0,94

Fonte: Palagi (2015)
CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais
Valores de P para cada contraste proposto (controle vs. demais, óleos essenciais e levedura vs. levedura com óleos essenciais e levedura vs. levedura)

Gráfico 3 – Área abaixo da curva (AAC) para as concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/dL}$) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Gráfico 4 – Concentração plasmática estimada e observada de insulina ($\mu\text{U/dL}$) nos diferentes tempos (minutos) e tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais, levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CT obs.: controle observado; lev. obs.: levedura observada; óleo obs.: óleo essencial observado; lev. + óleo obs.: levedura com óleo observado

CT est.: controle estimado; lev. est.: levedura estimada; óleo est.: óleo essencial estimado; lev. + óleo est.: levedura com óleo

5.3 GORDURA PLASMÁTICA

5.3.1 Triglicérides

O parâmetro fisiológico considerado normal para concentração plasmática de triglicérides em equinos varia de 4 a 44 mg/dL (BRUSS, 1980), sendo que os valores observados nesta pesquisa estão representados na Figura 5. Para tal parâmetro não foi observado efeito de tratamento ($P = 0,60$) (Tabela 7).

Figura 5 – Concentrações plasmáticas de triglicérides (mg/dL), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Tabela 7 - Médias e erro padrão da média (EPM) para a concentração plasmática de triglicérides (mg/dL), de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Variáveis (mg/dL)	Tratamentos				EPM			Contrastes (valores de P)		
	CON	LSC	OES	LSC+ OES				CON x demais	OES e LSC x OES + LSC	OES x LSC
Triglicérides	45,18	47,38	40,28	42,34	7,25	0,69	0,76			0,22

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Valores de P de cada contraste proposto (controle vs. demais, óleos essenciais e levedura vs. levedura com óleos essenciais e óleos essenciais vs. levedura)

5.3.2 Colesterol total e frações ligadas à proteína

As concentrações plasmáticas de colesterol total e frações estão dentro dos parâmetros adequados para equinos sugeridos por Bruss (1980), sendo os valores observados nesta pesquisa representados na Figura 6. No entanto, não foi possível observar efeito de tratamento para colesterol total ($P=0,47$), HDL ($P=0,71$), LDL ($P=0,67$) e VLDL ($P=0,60$) (Tabela 8).

Figura 6 - Concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL, LDL e VLDL (mg/dL), em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais

Fonte: Palagi (2015)

HDL: colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade, LDL: colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade, VLDL: Colesterol ligado à lipoproteína de muita baixa densidade

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Tabela 8 - Médias e erro padrão da média (EPM) para a concentração plasmática de colesterol total, HDL, LDL e VLDL (mg/dL), de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Variáveis (mg/dL)	Tratamentos			EPM	Contrastes (valores de P)		
	CON	LSC	OES		CON x demais	OES e LSC x OES + LSC	OES x LSC
Colesterol	112,25	111,44	110,41	6,66	0,18	0,86	0,41
HDL	66,63	66,64	65,71	3,29	0,65	0,68	0,32
LDL	36,5	35,3	36,58	5,11	0,54	0,94	0,29
VLDL	9,13	9,5	8,13	1,44	0,63	0,66	0,24

Fonte: Palagi (2015)

HDL: colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade, LDL: colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade, VLDL: colesterol ligado à lipoproteína de muita baixa densidade
CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Valores de P de cada contraste proposto (controle vs. demais, óleos essenciais e levedura vs. levedura com óleos essenciais e óleos essenciais vs. levedura)

5.4 pH FECAL

Os valores de pH fecal, nas diferentes faixas de horário estabelecidas, estão representados no gráfico 5, não sendo observado efeito de tratamento no presente estudo ($P=0,56$) (Tabela 9).

Gráfico 5 – Valores de pH fecal, em função dos diferentes tratamentos controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais

Fonte: Palagi (2015)

Faixa 1: 7h – 10h; Faixa 2: 10h – 13h; Faixa 3: 13h – 16h; Faixa 4: 16h – 19h

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Tabela 9 - Médias e erro padrão da média (EPM) para os valores de pH de acordo com os tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Variável	Tratamentos			EPM	Contrastes (valores de P)			
	CON	LSC	OES		LSC + OES	CON x demais	OES e LSC x OES + LSC	OES x LSC
pH	6,45	6,27	6,51	6,46	0,12	0,77	0,67	0,19

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Valores de P de cada contraste proposto (controle vs. demais, óleos essenciais e levedura vs. levedura com óleos essenciais e óleos essenciais vs. levedura)

5.5 POPULAÇÃO MICROBIANA DAS FEZES

Na quantificação dos micro-organismos presentes nas fezes foi observado efeito de tratamento da levedura viva com ou sem a inclusão de óleos essenciais para redução de *Fibrobacter succinogenes* ($P= 0,08$) (Figura 7). Houve efeito de interação levedura x óleos essenciais para diminuição de *Ruminococcus flavefaciens* ($P= 0,03$) (Figura 8) e efeito de levedura para o aumento de *Lactobacillus genus* ($P= 0,04$) (Figura 9).

Figura 7 – População relativa de *Fibrobacter succinogenes* nos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Figura 8 – População relativa de *Ruminococcus flavefaciens* nos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

Figura 9 – População relativa de *Lactobacillus genus* nos diferentes tratamentos (controle, levedura, óleos essenciais e levedura com óleos essenciais)

Fonte: Palagi (2015)

CON: controle; LSC: levedura *Saccharomyces cerevisiae*; OES: óleos essenciais; LOS: levedura *Saccharomyces cerevisiae* com óleos essenciais

6 DISCUSSÃO

Os efeitos relacionados com a suplementação de levedura *Saccharomyces cerevisiae* supostamente ocorrem pelo estímulo à atividade das bactérias celulolíticas, que melhora a digestibilidade da fibra e síntese de proteína microbiana (JOUANY et al., 2008), aumenta a proporção acetato:propionato, uma vez que o acetato é o principal produto da atividade fibrolítica no intestino, e, estabiliza o pH no ceco e cólon, provavelmente por aumentar a metabolização do lactato pelas bactérias ou limitar a sua produção principalmente pelo *Streptococcus* (CHAUCHEYRAS-DURAND; DURAND, 2010; MEDINA et al., 2002).

Com o objetivo de analisar a influência dos probióticos na alimentação equina Medina et al. (2002) utilizaram oito equinos adultos machos fistulados, alimentados com concentrado e volumoso em proporções iguais, com ou sem suplementação diária de 10g de *Saccharomyces cerevisiae* com concentração de $4,5 \times 10^9$ UFC/g, para avaliar após as refeições, as concentrações de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta, amônia, pH fecal e contagem das bactérias anaeróbias lácticas *Lactobacillus* e *Streptococcus*, através de amostras coletadas do conteúdo do cólon e ceco. A suplementação com *S. cerevisiae* aumentou a concentração de células vivas da levedura no ceco e cólon para o valor de $4,3 \times 10^6$ e $4,5 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente ($P < 0,001$). Aparentemente a suplementação com a cultura de levedura modificou o pH ($P < 0,005$) e as concentrações do ácido láctico e amônia. As alterações foram maiores no ceco do que no cólon, coincidindo com maior quantidade de células do probiótico, demonstrando que quando a digestão do concentrado no intestino delgado tornou-se saturada, o efeito da suplementação do probiótico limitou as mudanças indesejáveis no ecossistema intestinal dos equinos.

Embora no presente estudo não tenham sido avaliadas as concentrações de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta, N amoniacal e bactéria anaeróbia láctica *Streptococcus*, sendo a concentração de levedura usada maior do que a referida por Medina et al. (2002), os dados referentes à digestibilidade dos nutrientes e pH fecal sugerem que a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* não apresenta efeito, o que corrobora com os resultados obtidos por Mackenthun, Coenen e Vervuert (2013).

Segundo NRC (2007) a composição da dieta, particularmente em carboidratos, pode afetar a população microbiana no intestino grosso, assim como a proporção dos ácidos graxos a serem produzidos. Com isso, Mackenthun, Coenen e Vervuert (2013) propõe que o

desbalanceamento da dieta, com maior inclusão de concentrado pode evidenciar o efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma dieta para equinos com alta concentração de amido (3,4 g/kg de PV) está relacionada com a diminuição na concentração de bactérias celulolíticas e aumento no total de bactérias anaeróbias produtoras de lactato, principalmente *Lactobacillus* e *Streptococcus* no ceco (MEDINA et al., 2002), podendo desencadear quadros de acidose intestinal e laminite (ROWE; LEES; PETHICK, 1994) e segundo Radicke, Meyer e Kienzle (1994) a ingestão de 2g/kg de PV de amido já seria suficiente para promover o desequilíbrio da microbiota intestinal, sem comprometimento da sanidade dos animais. Portanto, no presente estudo a ingestão diária desse nutriente foi de 2,65 g/kg do PV, não sendo possível observar alterações metabólicas intestinais nos cavalos.

No entanto, a relação entre a composição da dieta e o efeito da suplementação com levedura parece não estar bem esclarecida e ser independente. Em estudo realizado por Jouany et al. (2008) foram utilizados oito cavalos alimentados com duas diferentes dietas (alta concentração de fibra e alta concentração de amido). Os parâmetros avaliados foram a digestibilidade aparente dos nutrientes e taxa de passagem, sendo os efeitos observados para a análise estatística a dieta, a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* e a interação entre ambos. Não foi verificado efeito significativo ($P > 0,05$) para interação dieta x suplementação em nenhuma das variáveis mensuradas, sendo que o tipo de dieta isoladamente aumentou a digestibilidade aparente da matéria orgânica ($P < 0,001$), matéria seca ($P < 0,001$) e proteína bruta ($P < 0,001$) quando presente altas concentrações de amido, enquanto a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* aumentou a digestibilidade aparente do FDA ($P = 0,038$) em ambas as dietas.

De acordo com Morgan et al. (2007) os resultados com o uso de levedura dependem de qualquer desafio nutricional ao qual o equino seja submetido, pois ao suplementarem 16 cavalos com cultura de levedura com diferentes qualidades de volumoso (feno de capim Bermuda de alta qualidade e de baixa qualidade), obtiveram maior digestibilidade dos nutrientes das dietas com feno de melhor qualidade ($P < 0,10$), não apresentando influência da suplementação com levedura ($P > 0,10$), mas sim interação entre a mesma e tipo de volumoso oferecido, sendo que a digestibilidade do FDN ($P = 0,08$), hemicelulose ($P = 0,004$) e proteína bruta ($P = 0,05$) aumentou nas dietas com baixa qualidade de volumoso, demonstrando que a cultura de levedura pode melhorar o aproveitamento da forragem da dieta.

Na literatura, os resultados quanto ao uso de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para equinos são distintos, estando relacionados às diferentes idades, raças e sexo dos animais utilizados nas pesquisas, assim como o fornecimento de diferentes quantidades de levedura,

ingredientes e dieta (FURTADO et al., 2010). Alterações nas proporções de volumoso e concentrado modificam a fermentação no intestino grosso e os produtos finais da digestão (HINTZ et al., 1971a), o que interfere nos demais parâmetros avaliados neste estudo.

Segundo Jouany et al. (2009), o mecanismo de ação predominante da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é interferir no metabolismo enzimático bacteriano, sem necessariamente alterar a população de micro-organismos, efeito este principalmente observado em dietas com alta concentração de carboidratos rapidamente fermentáveis, como o amido. Assim em trabalho realizado pelos mesmos autores em 2009, com a suplementação de equinos com 10g ($4,5 \times 10^9$ UFC/g) de levedura *Saccharomyces cerevisiae* alimentados com dieta de alta concentração de amido, obtiveram melhora na atividade enzimática relacionada com a degradação da parede celular dos vegetais e amido ($P < 0,10$) e aumento nas concentrações de bactérias fermentadoras de ácido láctico ($P = 0,067$) e *Lactobacillus spp* ($P = 0,099$). Tal resultado corrobora com o aumento nas concentrações de *Lactobacillus genus* encontrado no presente estudo, sem alterar a digestibilidade dos nutrientes, provavelmente pela quantidade excedente de amido presente na dieta, que pode ter alcançado o intestino grosso dos equinos.

Considerando a similaridade entre os processos fermentativos no rúmen e intestino grosso dos equinos ao considerarmos o efeito da levedura viva sobre os micro-organismos e seus mecanismos de ação, ela pode ser usada em ambas às espécies para estabilizar a microbiota promovendo efeitos benéficos ao animal (CHAUCHEYRAS-DURAND; FONTY, 2001). Em estudo desenvolvido por Martin et al. (2001) com quatro vacas fistuladas no rúmen alimentadas com dieta rica em amido, houve diminuição da atividade fibrolítica de três principais bactérias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*) sem redução na concentração das mesmas, ao contrário do observado neste estudo que apesar de não avaliar a atividade fibrolítica das bactérias encontrou diminuição na concentração de *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, e aumento na concentração de *Lactobacillus genus*.

Fatores como baixa temperatura, falta de sódio, inibição da ATPase da membrana celular bacteriana e presença de oxigênio podem atrapalhar a adesão das bactérias celulolíticas com a celulose, e consequentemente, afetar a degradação desse nutriente (ROGER et al., 1990). Através da alta atividade respiratória a levedura *Saccharomyces cerevisiae* parece reduzir a concentração de oxigênio do ambiente ruminal, favorecendo especificamente as bactérias anaeróbias (NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996). Segundo Mackenthun, Coenen e Vervuert (2013) tal efeito justifica a diferença dos resultados obtidos com a suplementação de levedura em cavalos fistulados e não fistulados, uma vez que em animais não fistulados o efeito parece ser

menor como no presente estudo, devido às baixas concentrações de oxigênio no ceco e cólon, enquanto que, nos cavalos fistulados o oxigênio pode entrar através das cânulas no intestino grosso, estimulando esse mecanismo de ação da levedura.

Os efeitos mais significativos no uso dos probióticos têm sido relatados quando os mesmos são incluídos na dieta durante períodos estressantes, que promovam uma alteração da microbiota intestinal do animal como o desmame, início de lactação e mudanças abruptas de dietas ricas em forragem para altas concentrações de carboidratos rapidamente fermentáveis sem adaptação prévia (CHAUCHEYRAS-DURAND; DURAND, 2010), situações que não estiveram presentes neste estudo.

Neste estudo foi usada uma mistura de óleos essenciais já prevendo o efeito de sinergismo que pode ocorrer entre tais compostos, uma vez que é conhecido o efeito antimicrobiano dos mesmos quando usados isoladamente, mas a eficácia de seus mecanismos de ação em conjunto ainda não foi bem estabelecida, podendo ocorrer sinergismo ou antagonismo entre eles o que promove diferentes resultados nas pesquisas (CALSAMIGLIA et al., 2007). A inconsistência de tais resultados também é consequência da ampla variedade nas concentrações dos princípios ativos que constituem os extratos das plantas, o que está relacionado com o cultivo, condições de crescimento ou métodos de processamento durante a extração, dependendo igualmente do tempo de adaptação do animal à administração dos mesmos (CASTILLEJOS et al., 2007).

A maior parte dos estudos para estabelecer os mecanismos de ação específicos dos óleos essenciais são desenvolvidos *in vitro* sendo as doses utilizadas em mg/L, mais elevadas do que as recomendadas para se trabalhar em condições *in vivo*, uma vez que a concentração das bactérias *in vitro* é menor do que *in vivo*, fazendo com que a concentração do composto de óleos essenciais precise ser maior, dificultando sua aplicabilidade. Isto provavelmente ocorre porque a atividade dos óleos essenciais depende da probabilidade do princípio ativo interagir com a bactéria, o que dependerá das concentrações dos mesmos e das bactérias somada à formação de um microambiente adequado (CHOW; VANKESSEL; RUSSEL, 1994). Com isso, a ausência de efeito do composto de óleos essenciais usado neste estudo pode ser justificada pela baixa dosagem administrada aos equinos.

Glade (1992) avaliou o efeito da suplementação de potros desmamados com o extrato de *Yucca shidigera* (100ppm) e cultura de levedura (20g/dia) sobre o metabolismo de nitrogênio e digestibilidade dos nutrientes. A adição do extrato aumentou a excreção de nitrogênio nas fezes, diminuindo sua digestibilidade aparente ($P < 0,01$), o que sugere que a saponina presente em tal composto se liga à amônia livre presente no intestino grosso, impedindo sua reabsorção e reciclagem. Quando adicionada a cultura de levedura houve uma potencialização de tal efeito. Ao

ser suplementado isoladamente o extrato de *Yucca shidigera* melhorou a digestibilidade do FDA ($P<0,05$), não havendo efeito somatório com a inclusão de levedura. De acordo com o autor isso aconteceu devido ao reduzido tempo de suplementação com o extrato (28 dias), que não foi suficiente para expressar o seu potencial de ação nos padrões de fermentação intestinal.

Oetting et al. (2006) estudaram o efeito sobre a digestibilidade da MS em leitões recém-desmamados suplementados com antimicrobianos e um composto de óleos essenciais provenientes do cravo, tomilho e orégano, acrescido de carvacrol e eugenol nas concentrações de 700, 1.400 e 2.100 ppm. A MS apresentou maior digestibilidade quando os animais foram suplementados com óleo essencial do que com antimicrobianos ($P<0,05$), uma vez que tal composto quando incluso na dieta pode aumentar a secreção de saliva, suco gástrico, suco pancreático, sais biliares e enzimas do intestino delgado, estimulando a redução do pH estomacal e intestinal, sendo que quanto maiores os níveis de inclusão melhores os resultados, o que explica a concentração de 2.100 ppm ter sido mais eficaz do que as demais. No entanto, os autores sugerem que mais pesquisas sejam conduzidas a fim de estabelecer melhores parâmetros sobre o uso dos óleos essenciais tais como a concentração de cada óleo, melhor combinação entre eles e nível de inclusão na dieta. Neste estudo a ação da levedura pode ter sido prejudicada pelo possível aumento da secreção de suco gástrico e diminuição do pH estomacal, sugeridos como efeito dos óleos essenciais, fazendo com que menor quantidade da mesma chegasse ao intestino grosso.

A ausência de efeito significativo no potencial antimicrobiano dos óleos essenciais também pode estar associada à boa digestibilidade da dieta basal fornecida, uma vez que ela mantém o desenvolvimento de adequada microbiota intestinal, diminuindo a ação dos extratos vegetais (LEE et al., 2003).

As respostas glicêmicas e insulinêmicas de equinos têm sido correlacionadas com o tipo de dieta oferecida ao animal, avaliando a influência dos diferentes processamentos de grãos e níveis de inclusão de amido. No entanto, existem poucas informações sobre a influência do uso de probióticos e óleos essenciais sobre tais parâmetros, correlacionando-os com os padrões de fermentação cecal, como feito nesta pesquisa.

Alimentos que contêm quantidades elevadas de carboidratos não estruturais estimulam à resposta insulinêmica, uma vez que a insulina é secretada quando as concentrações de glicose no sangue aumentam servindo para melhorar a sua absorção, mantendo adequados níveis glicêmicos (HINTZ; ARGENZIO; SCHRYVER, 1971; TREIBER et al., 2005). A quantidade de alimento e o tempo após a ingestão são importantes para avaliação de valores plasmáticos de insulina, visto que os picos de insulina plasmática podem até triplicar com o aumento do amido na dieta, quando comparado com os valores anteriores à ingestão do

alimento (GLADE; BIESIK, 1985).

Aumentar a disponibilidade do amido para a digestão enzimática permite uma melhor absorção do mesmo pelo intestino delgado, favorecendo maiores respostas glicêmicas e insulinêmicas (VERVUERT et al., 2009). Porém, ao aumentar a taxa de passagem do mesmo, assim como os níveis de inclusão na dieta, faz com que a capacidade de degradação pelo intestino delgado seja excedida, desencadeando efeitos negativos na digestibilidade pré-cecal do amido, menor resposta glicêmica e alteração na fermentação microbiana no ceco (RADICKE; MEYER; KIENZLE, 1994.; PAGAN; HARRIS, 1999), mudanças essas que podem ser controladas com o uso dos probióticos e óleos essenciais. Porém, no presente estudo a inclusão do probiótico e óleos essenciais não provocou alterações nos padrões de digestão pré-cecal de amido ou fermentação microbiana, que pudessem ser observados através da avaliação dos níveis plasmáticos de glicose e insulina.

Em experimento realizado por Taran (2011) com inclusão de diferentes níveis de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com concentração de 5×10^8 UFC/g, e dieta contendo maior proporção de concentrado (70% de concentrado e 30% de volumoso) houve aumento nos níveis de insulina quando feita a inclusão de 20g/dia da levedura ($P= 0,0012$), sem influenciar a resposta glicêmica. Françoso (2012) ao avaliar a inclusão de diferentes níveis de um composto de óleos essenciais, constituído majoritariamente de carvacrol, obteve maior resposta insulinêmica ($P= 0,05$), sem alterações nos níveis de glicose. Tais resultados corroboram com os obtidos no presente estudo em relação aos níveis de glicose, mas diferem no que se refere aos níveis plasmáticos de insulina, uma vez que não houve efeito de tratamento com a inclusão de composto de óleos essenciais e levedura quando administrados isoladamente ou em conjunto, o que pode ter ocorrido devido a diferenças existentes na concentração de levedura e composição dos óleos essenciais nos diferentes experimentos.

Os ácidos graxos de cadeia curta são absorvidos pela corrente sanguínea no intestino grosso na forma de ácidos livres, por difusão passiva através de mudanças no gradiente de pH, o que permiti manter padrões adequados de fermentação cecal. A taxa de absorção é inversamente proporcional ao peso molecular, sendo inicialmente absorvido acetato, propionato, butirato e lactato. Uma vez absorvidos passam pelo sistema porta hepático e circulam como ânions neutros no pH sanguíneo. O propionato é substrato gliconeogênico e contribui para o metabolismo da glicose, enquanto o acetato e butirato fornecem carbonos para a síntese de lipídeos (BRANDI; FURTADO, 2009; FRAPE, 2008), o que possibilitou que neste estudo a fermentação cecal fosse relativamente avaliada através dos níveis plasmáticos de triglicérides, colesterol total e frações de colesterol VLDL, LDL e HDL.

A produção de AGV no intestino é influenciada pela composição da dieta (FRAPE, 2008). Hintz, Argenzio e Schryver (1971) observaram que com dieta contendo 63% de milho moído houve aumento de propionato e diminuição de acetato no ceco, enquanto que no cólon os AGV totais diminuíram, sem comprometer a proporção entre acetato e propionato, o que corrobora com resultados encontrados por Medina et al. (2002), que mediante dieta contendo maior proporção de amido houve aumento de propionato e ácido láctico. Embora neste estudo não tenham sido mensurados os AGV, os resultados obtidos com os níveis de lipídeos plasmáticos, não indicam alterações nos padrões de fermentação no ceco e cólon, o que também corrobora com pesquisa desenvolvida por Françoso (2012) ao avaliar a inclusão de diferentes níveis de um composto de óleos essenciais, constituído predominantemente de carvacrol.

Novos estudos são necessários para avaliar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de equinos, podendo se trabalhar com maiores níveis de inclusão, assim como aumento na concentração dos produtos usados e fase de adaptação maior durante o período experimental.

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi realizado a inclusão de óleo essencial e levedura *Saccharomyces cerevisiae* na dieta não promove efeito sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes, resposta glicêmica e insulinêmica, pH fecal, perfil plasmático de triglicerídeos, colesterol e suas frações. No entanto, apresenta efeito sobre a quantificação da população microbiana nas fezes, sendo que novos estudos são necessários a fim de obter a melhor combinação entre levedura e óleos essenciais, assim como as concentrações adequadas para manifestação do potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, v. 29, p. 256-25, 2001.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAE, A.; FLEMMING, S. J.; SOUZA, A. G.; BONA FILHO, A. **Nutrição Animal/Alimentação Animal**. São Paulo: Nobel, 1984. v. 2, p. 299-307.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Gaithersburg, DC: AOAC., 2010.
- ARAI, T.; WASHIZU, T.; HAMADA, S.; SAKO, T.; TAKAGI, S.; YASSHIKI, K.; MOTOYOSHI, S. Glucose transport and glycolytic enzyme activities in erythrocytes of two- years-old thoroughbreds undergoing training exercise. **Veterinary Research Council**, n.18, p. 417-422, 1994.
- 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.
- 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. **Journal of Animal Science**. 83, p. 1549-1553, 2005.
- BERGMEYER, H. V. **Methods of enzymatic analysis**. Academic Press, 2nd ed. 1975. p. 1205-1214.
- BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E. Importância Nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 246 – 258, 2009.
- BRUSS, M. L. Lipids and ketones. **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic Press, 1980. p. 83-905.
- 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**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.
- CARVALHO, M.A.G. de. **Digestibilidade aparente em equinos submetidos a três condutas de arração**. 34f.(Tese de Mestrado) Escola de Veterinária da UFMG, Belo

Horizonte,1992.

CASTILLEJOSA, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRETA, A.; LOSAB, R. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, p. 186–201, 2007.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oils Research**, v. 12, p. 630-649, 2000.

CHAUCHEYRAS-DURAN, F; FONTY, G. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-107. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 57–6, 2001.

CHAUCHEYRAS-DURAN, F.; DURAND, H. Probiotics in Animal Nutrition and Health. **Beneficial Microbes**, v. 1, p. 3-9, 2010.

CHEN, Y. X.; LIU, H.; ZHANG, W. B.; JIN, Y. F. A novel tri-primer PCR method (TP-PCR) for rapid construction of fpg gene. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.359-364, 2004.

CHOW, J. M.; VAN KESSEL, J. A. S.; RUSSELL, J. B. Binding of Radiolabeled Monensin and Lasalocid to Ruminant Microorganisms and Feed. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1630-1635, 1994.

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.

COSETINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 130-135, 1999.

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

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.; 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.

DROUGOUL, C., FOMBELLE, A., 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.

ENGLYST, H. N.; HAY, S.; MACFARLANE, G. T. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, p.163-71, 1987.

FORHEAD, A. J.; FRENCH, J.; IKIN, P.; FOWLER, J. N.; DOBSON, H.; Relationship between plasma insulin and triglyceride concentrations in hipertriglyceridaemic donkeys. **Research Veterinary Science**; v. 56, p. 389-392, 1994.

FRANÇOSO, R. **Óleos essenciais na alimentação de equinos**. 2012. 82f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

FRAPE, D. **Nutrição e alimentação de equinos**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2008.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R.I; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, n.6, p.499-502, 1972.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p. 365-378. 1989.

FURTADO, C. D.; BARBOZA, E. D.; BRANDI, R. A.; RIBEIRO, L. B.; OLIVEIRA, A. A. M. A. Uso de levedura em equinos alimentados com dietas compostas de fenos de diferentes qualidades nutricionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.10, p.2194-2199, 2010.

GIRARDIN, M.; SEIDMAN, E. G.; Indications for the use of probiotics in gastrintestinal Diseases. **Digestive Diseases**, Switzerland, v. 29, p. 574-587, 2011.

GLADE, M. J.; GUPA, S.; REIMERS, T. J. Hormonal responses to high and low planes of nutrition in weanling thoroughbreds. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 658-665, 1984.

GLADE, M. J. Effects of *Yuccas shidigera* extract on feed utilization by equine weanlings. **Equine Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 93-98, 1992.

GLADE, M.J.; BIESIK, L.M.. Enhanced nitrogen retention in yearling horses supplemented with yeast culture. **Journal of Animal Science**. v. 62, p.1635-1640, 1985.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Products Reports Bioorganic Chemistry**, v. 14, p. 265-273, 1996.

GRAY, G. M. Starch digestion and absorption in nonruminants, **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 172-177, 1992.

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.

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.

HINTZ, H. F.; ARGENZIO, R. A.; SCHRYVER, H. F. Digestion coefficients, blood glucose levels, and molar percentage of volatile fatty acids in intestinal fluid of ponies fed varying forage-grain ratios. **Journal of Animal Science**, v. 33, p. 992-995, 1971c.

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.

HOWANITZ, P.J.; HOWANITZ, J. H.; HENRY, J.B. Carbohydrates. **Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods**, p. 172- 182, 1991.

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 high-starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 39-347, 2008.

JOUANY, J.P.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polyssacharidase and glycoside hydrolase activities in horses feed a high-fiber or high-starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 2844-2852, 2009.

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.

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

KIZIL, S.; SOGUT, T. Investigation of antibacterial effects of spices. **Crop Research**, v. 3, p. 86-90, 2003.

KRONFELD, D.S.; HOLLAND, J.L.; RICH, G.A.; MEACHAM, T.N.; FONTENOT, J.P. ; SKLAN, D.J.; HARRIS, P.A. Fat digestibility in Equus caballus follows increasing first order kinetics. **Journal of Animal Science**. v. 82, p.1773-1780, 2004.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEWIS, D. L. **Alimentação e cuidados dos cavalos**. Fort Collins, University, 1985.

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

LEE, K.W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H.J.; FREHNER, M.; LOSA, R.; BEYNEN, A. C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n. 3, p. 450-457, 2003.

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p. 747-748. 1965.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo: relatório final**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2006.

MACKENTHUN, E.; COENEN, M.; VERVUERT, I. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on apparent total tract digestibility of nutrients and fermentation profile in health horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 115-120, 2013.

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.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

MARTIN, C.; MILLE, L.; FONTY, G.; MICHALET-DOREAU, B. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 413-424, 2001.

MARTIN-ROSSET, W. **Nutrition et alimentation des chevaux**. Versaille Quae, 2012.

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 of horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2600-2609, 2002.

MELO, et. Al. Atividade antioxidante de Extratos de Coentro (*Coriandrum Sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 195-199, 2003. Suplemento.

MEYER, H. **Alimentação de cavalos**. São Paulo: Varela, 1995. p. 303.

MORGAN, L.M.; COVERDALE, J. A.; FROETSCHER, M. A.; YOON, I. Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 6, p. 260-265, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of horse**. 6th ed Washington, D.C.:NCR, 2007. p.341

NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F.M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 249-261, 1996.

OETTING, L. L.; UTIYAMA, C. E. ; GIANI, P. A.; RUIZ, U. S.; MIYADA, V. S. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1389-1397, 2006.

OITICICA, P.C. **Avaliação do efeito da suplementação dietética a base de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o ganho de peso, altura, perfil hematológico e índice de cólica de potros em crescimento.** Monografia de mestrado em Diagnóstico e Cirurgia de Equinos, Faculdade de Jaguariúna, São Paulo, 2007.

PAGAN, J.D.; HARRIS, P.A. The effects of timing and amount of forage and grain on exercise response in Thoroughbred horses. **Equine Veterinary Journal Supplements**. v.30, p. 451-457, 1999.

PEREIRA, J. R. A.; ROSSI, A. J. **Manual prático de avaliação nutricional dos alimentos.** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1988, p. 19-20.

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.

RANKIN, J. W. Glycemic index and exercise metabolism. **Sports Science Exchange**, v. 10, n. 1, p.154-164, 1997.

REHDER, V. L. G.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 67-71, 2004.

ROGER, V.; FONTY, G.; KOMISARCZUK-BONY, S.; GOUET, P. Effects of Physicochemical Factors on the Adhesion to Cellulose Avicel of the Ruminal Bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes subsp. Succinogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 3081-3087, 1990.

ROWE, B. J.; LEES, J. M.; PETHICK, D. W. Prevention of Acidosis and Laminitis Associated with Grain Feeding in Horses. **The Journal of Nutrition**, v. 124, p. 2742S-2744S, 1994.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. 48 p. (Série Documentos, 20).

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. In: HELWIG, J. T.; COUNCIL, K. A. (Ed.). **SAS user's guide**. Raleigh, NC: SAS Institute, Inc., 2004.

SCHNEIDER, B.H.; FLATT, W.P. **The evaluation of feeds through digestibility experiments**. Athens: University of Georgia Press, 1975. 423p.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, p. 29-44, 1983.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002. 235 p.

SILVA, A.B.; SILVA, T.; FRANCO, E.S.; RABELO, S.A.; LIMA, E.R.; MOTA, R.A.; CÂMARA, C.A.G.; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, RADDI). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 158-163, 2010.

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.

TARAN, F. M. P. **Avaliação do uso de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para Equinos**. 2011. 80f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 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.

TONKK, D.B. **Quality control in clinical laboratories**. Searborough: Diagnostic Reagents, 1972.

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.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne

pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

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.

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

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

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.

VERVUERT, I.; VOIGT, K.; HOLLANDS, T.; CUDDEFORD, D.; COENEN, M. Effect of feeding increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in healthy horses. **The Veterinary Journal**. v. 182, p. 67-72, 2009.

WEESE, J. A. Review of probiotics: are they really “functional foods”. **AEEP Proceedings**, v. 47, p. 27-31, 2001.

WEESE, J. A., ANDERSON, M., LOWE, A., MONTEITH, G. J. Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. **Canadian Veterinary Medical Association**, v.44, p. 299-302, 2003.