



**Catarina
Isabel
Sintra Luz**

**Desenvolvimento de uma formulação não
farmacológica para controlo da diarreia pós-
desmame em leitões**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico esta dissertação à minha família, ao Rui e a todos os meus amigos, pelo o apoio ao longo desta etapa académica.

o júri

presidente

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
professor auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutor Mário Manuel Quialheiro Simões
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem o apoio incondicional da minha família e amigos. À minha família que, mesmo a 500 km de distância, permaneceu sempre presente e com o apoio motivacional para que tudo isto fosse concretizado. Ao Rui, pelo constante apoio e por nunca me deixar vacilar. A todos os meus amigos, mas em especial à Fátima, Rita, Carolina, Joana e Marianas pelo carinho e apoio e por me fazerem sempre lutar por aquilo que gosto e por novos desafios. Ao professor Pedro Domingues, pela sua orientação e disponibilidade e pelo seu conhecimento transmitido. Por toda a ajuda na elaboração desta dissertação. À Engenheira Salomé, aos Engenheiros Nuno Guedes e João Almeida e à Dra. Rosa, pelo apoio e orientação na empresa. Um agradecimento especial pela possibilidade de realização deste desafio e transmissão de conhecimento em controlo de qualidade alimentar e inovação nutricional animal. Ainda, aos trabalhadores do laboratório da DIN, por todo o conhecimento que me transmitiram. À Inês e ao Professor Dr. Divanildo da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela possibilidade de realização dos estudos *in vivo* nas explorações desta Universidade.

palavras-chave

E.coli, ETEC, Diarreia pós-desmame (DPD), leitão, desordens entéricas, tratamento não farmacológico, estudos de estabilidade acelerados e de longa duração.

resumo

A diarreia pós-desmame (DPD) nos leitões é uma doença multifatorial, caracterizada por alterações entéricas propícias à infeção intestinal por *Escherichia coli* enterotoxigénica e pela elevada mortalidade destes animais após o seu desmame, representando perdas económicas elevadas para a indústria suína. Apesar do tratamento farmacológico com antibióticos ser eficaz no controlo de DPD, a sua utilização é limitada devido ao desenvolvimento de bactérias multi-resistentes a vários antibióticos e o perigo, subjacente, para a saúde pública. Desta forma, é imperativo o desenvolvimento de estratégias não farmacológicas para o controlo de DPD. Esta dissertação foca-se primeiro no desenvolvimento de um produto líquido único e completo, que promova o controlo desta doença, sem recorrer a antibióticos. O produto Swine Sweet Health apresenta na sua constituição diversos compostos ativos interessantes, como glucose, sais, mistura de ácidos orgânicos, cinamaldeído e ácido láurico, com potencial para atuar nas várias vertentes do problema, como o tratamento da desidratação e infeção bacteriológica intestinal nestes animais. Para além disso, contém palatilizantes, na tentativa de incremento das ingestões e minimização da mortalidade. Após o desenvolvimento de três formulações do produto no laboratório da D.I.N., diferenciadas pela presença de cinamaldeído, ácido láurico ou ambos estes compostos, realizaram-se estudos de aceitabilidade do produto nos animais, nas explorações da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, e estudos de estabilidade de um mês, segundo a legislação nacional e europeia. Estes estudos demonstraram uma ausência de rejeição destas formulações do produto *in vivo* e a garantia de estabilidade físico-química e microbiológica destes ao fim de um mês, mesmo quando sujeitos a temperaturas elevadas, até 41,5 °C. Assim que ficar demonstrada a sua estabilidade, a longo prazo, e o seu potencial *in vivo*, este produto final poderá ser comercializado e terá um elevado impacto no mercado, inserindo-se num segmento de mercado não explorado em Portugal para produtos líquidos, pelas empresas nacionais de alimentação animal.

keywords

E. coli, ETEC, post-weaning diarrhea (DPD), piglet, enteric disorders, non-pharmacological treatment, accelerated and long-term stability studies.

abstract

Post-weaning diarrhea (DPD) in piglets is a multifactorial disease, characterized by enteric changes associated with intestinal infection by enterotoxigenic *Escherichia coli* and by high mortality of these animals after weaning, representing high economic losses for pig industry. Although the effective pharmacological antibiotic treatment for DPD control, its use is reduced through the development of multi-resistant bacteria to various antibiotics and the underlying danger to public health. Thus, it's imperative the development of non-pharmacological strategies for DPD control. This dissertation focuses, first, on the development of a unique and complete liquid product, named Swine Sweet Health, that promotes the control of this disease without using antibiotics. This product contains in its constitution several interesting active compounds, such as glucose, salts, a mixture of organic acids, cinnamaldehyde, and lauric acid, with the potential to act on the various aspects of the problem, such as the treatment of dehydration and intestinal bacteriological infection in these animals. In addition, it contains palatalizing agents, in the attempt to increase the ingestion of this product and minimization of the mortality. After the development of three different formulations of the product, in the DIN laboratory, product acceptability studies were carried out on animals at the University of Trás-os-Montes e Alto Douro. Also, stability studies of one month, were performed, according to National and European legislation. These studies demonstrated a lack of rejection of these formulations *in vivo* and the assurance of physical-chemical and microbiological stability of these formulations at one month, even when subjected to elevated temperatures, up to 41,5°C. Once its long-term stability and *in vivo* potential have been proven, this final product can be commercialized and will have a high impact on the market, being part of a market segment not exploited in Portugal, for liquid products, by national animal feed companies.

Abreviaturas

DPD - Diarreia pós-desmame	XOS - xilooligosacarídeos
ETEC - <i>Eschericia coli</i> enterotoxigénica β -hemolítica	SCFA - ácidos gordos de cadeia curta
IL-1 β - interleucina 1 β	células NK - células assassinas naturais, do inglês “ <i>Natural Killer Cells</i> ”
TNF α - fator de necrose tumoral- α	ZnO - óxido de zinco
IL-6 - interleucina-6	IGF-I – fator de crescimento de insulina I
AIDA-I - adesina envolvida na aderência difusa	IGF-II – fator de crescimento de insulina II
Paa – adesina de aderência anexada de suíno, do inglês “ <i>Porcine attaching adherence</i> ”	IGF-IR - recetor do fator de crescimento de insulina I
Eae – adesina intimina	NRC – Conselho Nacional de Pesquisa
LT - toxinas termo-lábeis	ZnM - metionina de zinco
STa - toxina termo-estável a	NHDC - neohespiridina dihidrocalcona
STb - toxina termo-estável b	SGLT1- cotransportador de Na ⁺ /Glucose
EAST1 - enterotoxina termo-estável de <i>E.coli</i> enteroagregativa 1	DGV - Direção-geral de Veterinária
LPS - lipopolissacarídeo	INFARMED - Instituto nacional da farmácia e do medicamento
CFTR- regulador de condutância transmembranar de fibrose cística	EMA - Agência medicinal europeia
5-HT - serotonina	ICH - Conferência Internacional sobre harmonização
PGE2 - prostaglandina 2	E432 – Emulsificante Tween 20
GTP - trifosfato de guanosina	UTAD- Universidade de Trás dos Montes
AGP - antibióticos promotores do crescimento	HPLC – Cromatografia líquida de alta performance
PBP - proteína que liga penicilina	GC-FID - Cromatografia gasosa- detector de ionização de chama
SPD - plasma seco por pulverização	PCA – do inglês “ <i>plate count agar</i> ”
FOS - frutooligossacarídeos	APT – água peptonada tamponizada
TOS - transgalactooligossacarídeos	TBX – do inglês “ <i>Tryptone-bile-glucuronic medium</i> ”
GOS - galactooligossacarídeos	DRBC - do inglês “ <i>Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar</i> ”
MOS - mananooligossacarídeos	

ISO - Organização internacional para
padronização

ANOVA – análise de variância

Lista de Tabelas

Tabela 1- Condições de armazenamento para estudos de estabilidade térmica e sensibilidade à humidade de produtos, com comercialização em zonas climáticas I e II, pertencentes às comunidades europeias, segundo as diretrizes VICH GL3.

Tabela 2- Aparência visual e valores da absorvância medida a 502 nm e da turbidez média calculada dos triplicados de emulsões do óleo de coco em água, na presença de diferentes percentagens dos emulsificantes Tween 20 (E432; T20) e mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol (E1) e/ou de etanol.

Tabela 3- Caracterização estatística descritiva dos animais como um único grupo ou por discriminação de sexo, analisando por tratamento ou no total, em termos de idade média (dias) e peso inicial médio (kg) destes animais.

Tabela 4- Caracterização estatística descritiva dos animais por discriminação de idades, aquando do início do estudo, de 23, 25 ou 27 dias, analisando o peso inicial médio (kg) por tratamento ou no total, por idade.

Tabela 5- Valores de ingestões médias de líquidos e sólidos e pesos médios nos dias 1, 2 e/ou 3 de estudo, para os diferentes tratamentos, considerando os 8 casos de diarreia no dia 3 de estudo. Destes 8 casos, 3 estão sujeitos à formulação de cinamaldeído, 3 sujeitos à formulação de cinamaldeído e ácido láurico, 1 pertencente ao grupo controlo e 1 com fornecimento da formulação contendo apenas ácido láurico.

Tabela 6- Valores de pesquisa de *Salmonella* e contagem de microrganismos totais, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Bolores, leveduras e *Estafilococcus* da formulação contendo apenas cinamaldeído, nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Tabela 7- Valores de pesquisa de *Salmonella* e contagem de Bolores, leveduras, *E. coli*, *Estafilococcus*, *Enterobacteriaceae* e microrganismos totais, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Tabela 8- Valores de pesquisa de *Salmonella* e contagem de Bolores, leveduras, *E. coli*, *Estafilococcus*, *Enterobacteriaceae* e microrganismos totais, da formulação contendo

cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Lista de Figuras

Figura 1- Valores ingestão diária média de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com emulsão de óleo de coco apenas ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando os 48 animais.

Figura 2- Valores de ingestão média total de líquidos, após os três dias de administração, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os 48 animais.

Figura 3- Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando os 48 animais.

Figura 4- Valores de ingestão média total de ração sólida, após os três dias de administração, em percentagem, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os 48 animais.

Figura 5- Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os 48 animais.

Figura 6 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os animais do sexo feminino (A) e do sexo masculino (B).

Figura 7 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando apenas os animais com 23 dias de idade.

Figura 8 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas,

com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando apenas os animais com 25 dias de idade.

Figura 9 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controle) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando apenas os animais com 27 dias de idade.

Figura 10 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controle) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando apenas os animais com idades compreendidas entre os 23 e 25 dias (A) e os 27 e 31 dias (B).

Figura 11 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controle e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando idades médias por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidas entre os 23 e 25 dias (A) e os 26 e 29 dias (B).

Figura 12 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controle e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando idades médias por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidas entre os 23 e 25 dias (A) e os 26 e 29 dias (B).

Figura 13 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controle e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 14,0 e 16,5 kg.

Figura 14 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controle e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos

combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 16,5 e 19,0 kg.

Figura 15 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 19,0 e 21,5 kg.

Figura 16 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 14,0 e 16,5 kg.

Figura 17 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 16,5 e 19,0 kg.

Figura 18 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 19,0 e 21,5 kg.

Figura 19 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos por análise da solução através de espectrofotómetro de UV/Visível, nos dias 1 (A), 15 (B) e 30 (C) de estudo a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, e da água destilada. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação na aparência desta.

Figura 20- Valores de pH, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da

temperatura de armazenamento da formulação na sua estabilidade química, que se reflita em alterações da concentração de íons H^+ em solução.

Figura 21- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação no seu estado de oxidação.

Figura 22- Valores da concentração de íons Na^+ , K^+ e Cl^- , da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura na estabilidade destes íons em solução.

Figura 23- Valores da concentração de glucose, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 e 15 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura na estabilidade deste componente da formulação em solução.

Figura 24- Valores de pH, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação na sua estabilidade química, que se reflita em alterações da concentração de íons H^+ em solução.

Figura 25 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação de cinamaldeído original (A) e desta formulação em meio ácido (HCl 0,1 M), meio básico (NaOH 0,1 M) e sob oxidação (3 % H_2O_2), obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (B) e 4 (C) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação na aparência desta.

Figura 26- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica da formulação no seu estado de oxidação.

Figura 27- Valores da concentração de íons Na^+ e K^+ , obtidos no dia 2 de estudo, e de Cl^- , obtidos nos dias 1 e 4 de estudo, da formulação contendo apenas cinamaldeído, após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2), de

forma a avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação, na estabilidade destes iões em solução.

Figura 28- Cromatogramas da concentração de glucose, avaliada por HPLC com um detetor RI, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos para um padrão de 1% de glucose (A), para a formulação original de cinamaldeído (B), a partir da qual se prepararam as soluções para o estudo acelerado, e após indução de oxidação (3 % H₂O₂) nos dias 1 (C) e 4 (D), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (E) e 4 (F) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (G) e 4 (H) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade deste componente em solução.

Figura 29 – Isomerização da D-glucose a D-frutose, em meio ácido e básico ¹⁵³.

Figura 30- Degradação da glucose em meio ácido e básico por glicosilação, epimerização, isomerização e oxidação. Adaptado de ¹⁵³.

Figura 31- Cromatogramas do perfil lipídico da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtido por GC-FID para a formulação original de cinamaldeído (A), a partir da qual se prepararam as soluções para o estudo acelerado, após indução de hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e oxidação (3 % H₂O₂) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo acelerado. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade do ácido láurico em solução.

Figura 32 – Espectros da absorvância, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos por análise da solução através de espectrofotómetro de UV/Visível, nos dias 1 (A), 15 (B) e 30 (C) de estudo a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação na aparência desta.

Figura 33- Valores de pH, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação na sua estabilidade química, que se reflita em alterações da concentração de iões H⁺ em solução.

Figura 34- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação no seu estado de oxidação.

Figura 35- Valores da concentração de íons Na^+ , K^+ e Cl^- da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura da formulação, na estabilidade destes íons em solução.

Figura 36- Valores da concentração de glucose, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos, por HPLC, nos dias 1 e 15 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura na estabilidade deste componente da formulação em solução.

Figura 37- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos no dia 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura da formulação na estabilidade deste composto em solução.

Figura 38- Valores de pH, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação na sua estabilidade química, que se reflita em alterações da concentração de íons H^+ em solução.

Figura 39 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco original (A) e as formulações obtidas colocando esta em meio básico (NaOH 0,1 M) (1), meio ácido (HCl 0,1 M) (2) e sob oxidação (3 % H_2O_2) (2), obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (B) e 4 (C) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação na aparência desta.

Figura 40- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e hidrólise

básica (NaOH 0,1 M). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica da formulação no seu estado de oxidação.

Figura 41- Valores da concentração de íons Na^+ e K^+ , obtidos no dia 2 de estudo, e de Cl^- , obtidos nos dias 1 e 4 de estudo, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2), de forma a avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação, na estabilidade destes íons em solução.

Figura 42- Cromatogramas da concentração de glucose, avaliada por HPLC, com um detector RI, obtidos para a formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco (A), a partir da qual se prepararam as soluções sob stress, e para esta após indução de oxidação (3 % H_2O_2) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M), nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade deste componente em solução.

Figura 43- Cromatogramas do perfil lipídico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtido por GC-FID após injeção desta formulação original (A), a partir da qual se preparam as soluções de stress dos estudos acelerados, e desta após indução de hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e oxidação (3 % H_2O_2) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade do ácido láurico em solução.

Figura 44- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade deste componente em solução.

Figura 45- Espectros da absorvância, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos por análise da solução, através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (A), 15 (B) e 30 (C) de estudo, a 5 °C (2A, 2B e 2C), 25 °C (1A, 1B e 1C) e 41,5 °C (2A, 2B e 1C). Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação na aparência desta.

Figura 46- Valores de pH, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação na sua estabilidade química, que se reflita em alterações da concentração de íons H⁺ em solução.

Figura 47- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Desta forma, é possível avaliar a influência da temperatura de armazenamento da formulação no seu estado de oxidação.

Figura 48- Valores da concentração de íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura da formulação, na estabilidade destes íons em solução.

Figura 49- Valores da concentração de glucose, obtidos por HPLC, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 15 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura na estabilidade deste componente da formulação em solução.

Figura 50- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos no dia 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, de forma a avaliar a influência da temperatura da formulação na estabilidade deste composto em solução.

Figura 51- Valores de pH, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H₂O₂). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação na sua estabilidade química, que se reflita em alterações da concentração de íons H⁺ em solução.

Figura 52 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco original (A), em meio básico (NaOH 0,1 M) (1), meio ácido (HCl 0,1 M) (3) e sob oxidação (3 % H₂O₂) (2), obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (B) e 4 (C) de

estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação na aparência desta.

Figura 53- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica da formulação no seu estado de oxidação.

Figura 54- Valores da concentração de íons Na^+ e K^+ , obtidos no dia 2 de estudo, e de Cl^- , obtidos nos dias 1 e 4 de estudo, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2), de forma a avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação, na estabilidade destes íons em solução.

Figura 55- Cromatogramas da concentração de glucose, avaliada por HPLC, com um detetor RI, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos para esta formulação original (A), a partir da qual foram preparadas as soluções de indução de stress dos estudos acelerados, e desta após indução oxidação (3 % H_2O_2) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade deste componente em solução.

Figura 56- Cromatogramas do perfil lipídico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtido por GC-FID desta formulação original (A), utilizada na produção das soluções de stress deste estudo acelerado, e desta após indução de hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e oxidação (3 % H_2O_2) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo. Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade do ácido láurico em solução.

Figura 57- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2). Desta forma, é possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade deste componente em solução.

Índice

CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO	1
1. DIARREIA PÓS-DESMAME	2
1.1. ETIOLOGIA.....	2
1.2. PATOLOGIA.....	4
1.3. DIAGNÓSTICO	6
1.4. PREVENÇÃO.....	7
1.5. TRATAMENTO	8
1.5.1. <i>Estratégias Terapêuticas Farmacológicas</i>	9
1.5.2. <i>Estratégias Terapêuticas Não Farmacológicas</i>	10
1.5.2.1. Prebióticos.....	10
1.5.2.2. Probióticos	12
1.5.2.3. Simbióticos.....	15
1.5.2.4. Ácidos orgânicos.....	16
1.5.2.5. Óxido de Zinco.....	18
1.5.2.6. Outros compostos.....	20
2. DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES PARA USO VETERINÁRIO.	21
3. CONCLUSÃO.....	24
CAPÍTULO II- ESTUDO DOS COMPONENTES E DAS CARACTERÍSTICAS ÓTIMAS PARA A CRIAÇÃO DE UM PRODUTO COM POTENCIAL NO CONTROLO DA DPD EM LEITÕES.	27
CAPÍTULO III- MATERIAIS E MÉTODOS	35
1. MATERIAIS	35
2. PRODUÇÃO DAS TRÊS FORMULAÇÕES DO PRODUTO.....	36
3. ESTUDO DE ACEITABILIDADE.....	37
4. ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	38
5. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	49
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	51
2. ESTUDOS DE ACEITABILIDADE	55
3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	79
3.1. ESTUDO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO COM CINAMALDEÍDO	80
3.2. ESTUDO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO COM A EMULSÃO DE ÓLEO DE COCO	100

3.3. ESTUDO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO COM CINAMALDEÍDO E EMULSÃO DE ÓLEO DE COCO.....	119
CAPÍTULO V- CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	139
CAPÍTULO VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
CAPÍTULO VII- ANEXOS	153

Capítulo I- Introdução

O desmame é a fase mais crítica e problemática do desenvolvimento dos leitões para a indústria suína. O desmame natural ocorre perto das 17 semanas após o nascimento dos leitões. No entanto, o desmame destes animais é normalmente praticado entre as 3 e as 5 semanas de idade.^{1,2} Com esta idade, os leitões apresentam um trato gastrointestinal ainda imaturo e sem capacidade de resposta a invasores externos. Assim, o desmame está associado frequentemente a infeções entéricas, diarreia e mortalidade destes animais, representando perdas económicas elevadas para a indústria dos suínos.^{1,3}

Uma das doenças mais comuns, derivada de infeções entéricas intestinais, nesta fase do desenvolvimento dos leitões é a diarreia pós-desmame (DPD). Esta deve-se normalmente a baixa resistência a doenças, associada a desordens gastrointestinais e stress, com impacto no desenvolvimento e na morbilidade e mortalidade dos leitões.¹ A DPD está associada à morte de 17% dos leitões na Europa e ocorre mais frequentemente nas duas primeiras semanas após o desmame.³ Atualmente, existem diversos antibióticos que são utilizados para tratar as infeções entéricas nos leitões. No entanto, devido à resistência bacteriana a estes agentes antimicrobianos e à necessidade de reduzir o consumo de antibióticos, tornou-se imprescindível o desenvolvimento de formulações para tratamento não farmacológico da DPD¹. O objetivo destas formulações é tratar os animais sem induzir perigo para a saúde pública.

Este estágio, desenvolvido em parceria com a empresa D.I.N. - Desenvolvimento e Inovação Nutricional, S.A., visa o desenvolvimento de uma formulação líquida estável em termos físico-químicos e microbiológicos para terapêutica não farmacológica de DPD. A D.I.N., localizada na zona industrial da Catriã, Santa Comba Dão-Viseu, é uma empresa inserida no sector de mercado nacional e internacional de fabricação de alimentos para aves, suínos e bovinos. Esta produz rações, matérias-primas, pré-misturas e dietas específicas para determinadas fases do desenvolvimento animal. Atualmente, apresenta uma vasta gama de produtos sólidos para a alimentação animal e quer apostar no desenvolvimento de produtos líquidos, incluindo este para tratar a DPD nos leitões na fase pós-desmame. Tendo em conta este objetivo, é importante entender as causas, a patologia, o diagnóstico, o tratamento da DPD, tanto farmacológico como não farmacológico, e os estudos de estabilidade necessários para a produção de uma formulação passível de ser comercializada. Assim, será possível

produzir um produto estável in vitro, segundo as normas portuguesas, com potencial para tratar esta doença.

1. Diarreia Pós-Desmame

A diarreia pós-desmame (DPD) caracteriza-se por desidratação severa, mortalidade significativa e perda de peso corporal dos leitões sobreviventes.⁴ Os leitões são sujeitos a alterações ambientais, sociais e dietéticas repentinas, induzindo alterações na ingestão alimentar, enfraquecimento do sistema imunitário e comprometimento da sua saúde intestinal.¹ Na fase pós-desmame, ocorre alteração no microbioma intestinal e maior predisposição para infeções intestinais, principalmente por *Eschericia coli* enterotoxigénica (ETEC).^{1,2} O conhecimento da etiologia, das formas de diagnóstico e da patologia desta doença é essencial para o estabelecimento de medidas preventivas e de formas de tratamento da DPD. Uma das principais estratégias de prevenção e tratamento desta doença envolve a manutenção do equilíbrio microbiano intestinal e a promoção do crescimento destes animais na fase pós-desmame.³ Visando a diminuição da recorrência aos antibióticos, tem se investigado o papel de vários aditivos, como probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e óxido de zinco, no tratamento da DPD nos leitões⁴. Recorrendo a estes compostos poderá ser possível desenvolver uma formulação terapêutica com potencial para controlar a DPD nos leitões.

1.1. Etiologia

O desmame dos leitões é caracterizado pelo stress social, nutricional e ambiental induzido nestes animais e alterações na fisiologia, microbiologia e imunologia do trato gastrointestinal.⁵ Estas modificações promovem uma baixa resistência à colonização por bactérias patogénicas ingeridas e predisposição para infeções entéricas.^{6,7} Estas infeções manifestam-se posteriormente em diarreia e depressão do crescimento destes animais.

A principal causa de desenvolvimento de DPD é o stress social, nutricional e ambiental induzido nos leitões. No desmame, ocorre interrupção da interação social dos leitões com a mãe e os outros animais, mistura dos leitões de diferentes produções e substituição abrupta do leite por dietas sólidas, menos digeríveis e sem disponibilização de

anticorpos e outros compostos essenciais para a imunização e crescimento dos leitões.^{8,9} Para além disto, ocorrem alterações ambientais, como a falta de higiene, de controlo adequado da temperatura, idealmente 33°C, e de circulação de ar.¹⁰ Este stress social, nutricional e ambiental induzido nos leitões reduz a ingestão alimentar, o crescimento dos animais e a capacidade de indução de respostas imunológicas e induz alterações nas diferentes partes do trato gastrointestinal do animal.^{5,11,12} Assim, ocorre uma redução da resistência a infeções intestinais.

No desmame ocorrem mudanças funcionais e estruturais nas várias partes do trato gastrointestinal imaturo, que promovem a proliferação de bactérias patogénicas neste.⁵ No estômago, o pH gástrico encontra-se elevado graças à imaturidade do trato gastrointestinal, com baixa produção do ácido gástrico e diminuição da produção de ácido láctico a partir da lactose do leite.⁵ Este aumento de pH põe em causa a ação bactericida do pH baixo e a função digestiva gástrica, principalmente proteica, com redução da atividade da pepsina.^{13,14} Para além da alteração do pH, há uma redução da motilidade e esvaziamento gástricos, graças à baixa ingestão alimentar e alteração da composição dietética.¹⁵ Assim, promove-se a passagem de microrganismos patogénicos ingeridos na dieta e a sua proliferação intestinal.

Na fase pós-desmame, existem também alterações estruturais e funcionais no intestino delgado, promotoras do desenvolvimento de DPD. Os leitões apresentam uma alteração da arquitetura intestinal normal, com redução da altura das vilosidades e aumento da profundidade das criptas.⁵ Estas alterações estruturais devem-se, principalmente, à anorexia e ao stress induzido nos animais, com promoção de respostas inflamatórias locais.^{16,17} Na fase pós-desmame, verifica-se um aumento do número de células imunitárias como as células T CD2⁺ e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6).¹⁷ As alterações estruturais, a imaturidade intestinal e a redução da ingestão alimentar promovem alterações da função digestiva intestinal, com redução da atividade de dissacaridases e proteases na superfície apical dos enterócitos.^{8,18} Assim, as alterações estruturais e funcionais no intestino delgado induzem a redução da absorção intestinal de nutrientes¹⁹ e a redução da produção de muco intestinal, promovendo-se a colonização bacteriana intestinal e a passagem dos nutrientes não digeridos para o intestino grosso.²⁰

O último segmento do trato gastrointestinal sofre alterações estruturais e funcionais após o desmame. No intestino grosso, ocorre redução da densidade de criptas no ceco e da capacidade de absorção de água e eletrólitos no cólon.²¹ Para além disso, os nutrientes dietéticos não digeridos são fermentados pelos microrganismos residentes, promovendo a produção de compostos potencialmente tóxicos e ácidos gordos de cadeia ramificada e a alteração do pH local. Os compostos tóxicos, prejudiciais para o epitélio intestinal, incluem o indol, os fenóis, a amónia e as aminas biogénicas.²² As alterações morfológicas, a diminuição da reabsorção de sais e água e a alteração do pH predispoem para o desenvolvimento de DPD.

As alterações ao longo do trato gastrointestinal promovem a modificação do microbioma gastrointestinal. Na fase-pós desmame ocorre a diminuição da diversidade microbiana⁴ e das bactérias benéficas, como a população de *Lactobacilli*, incluindo *L. sobrius*, *L. acidophilus* e *L. reuteri* no cólon e íleo, e aumento das populações de bactérias potencialmente patogénicas como coliformes e *E.coli*.²³ Assim, aumenta-se a suscetibilidade dos leitões a colonização intestinal de microrganismos patogénicos e o desenvolvimento de DPD.

Concluindo, vários fatores sociais, ambientais, nutricionais induzidos nos leitões e a imaturidade do trato gastrointestinal destes animais após o desmame predispoem para DPD. Ocorrem alterações estruturais e funcionais no estômago e no intestino delgado e grosso, que perturbam a digestão e promovem a proliferação de bactérias patogénicas. Assim, induz-se uma predisposição para DPD nos leitões.

1.2. Patologia

Nas duas primeiras semanas após o desmame, os leitões com DPD apresentam diarreia abundante, desidratação e letargia.¹ Estes sintomas estão associados ao mau funcionamento gastrointestinal e à ingestão de microrganismos patogénicos, promotores da baixa absorção de nutrientes, iões e água e elevada secreção de iões e água.⁷ A patogénese desta doença ainda não está totalmente conhecida. Esta está tipicamente associada a infeções intestinais por estirpes da bactéria *Escherichia coli* enterotoxigénica β -hemolítica (ETEC), sendo denominada muitas vezes de colibacilose.⁴ A *E.coli* patogénica de suíno mais predominante envolvida em DPD na maioria dos países pertence ao serogrupo O149.⁴

Assim, a colonização intestinal desta poderá predispor para a diarreia e desidratação associadas a esta doença.⁶

Após o desmame, a ETEC é ingerida e passa através do estômago para o intestino, onde se multiplica rapidamente e produz os seus agentes de virulência. Estes agentes incluem as adesinas fimbriais (principalmente F4 e F18), e não-fimbriais (paa, EAE e AIDA-I), e as enterotoxinas.^{4,24} A subunidade principal (FaeG) da variante F4ac de F4 e a subunidade menor (FedA) da variante F18ac da F18 são as que estão envolvidas na adesão intestinal bacteriana, essencial para a patogênese de DPD.^{25,26} As adesinas de ETEC medeiam a adesão bacteriana à mucosa intestinal através da ligação a recetores específicos na membrana apical dos enterócitos e a subsequente colonização do intestino delgado dos leitões e produção das enterotoxinas.^{4,25} Estas enterotoxinas incluem as toxinas termo-lábeis (LT) e as toxinas termo-estáveis (STa, STb e EAST1) e são internalizadas nos enterócitos por endocitose mediada por recetores.⁴ Nos enterócitos ativam a produção das enzimas adenilato e guanilato ciclases, promovendo o aumento da concentração intracelular de monofosfatos cíclicos de adenosina (cAMP) e de guanosina (cGMP).^{27,28} O processo pelo qual estes induzem a hipersecreção de iões, como o Na⁺ e o Cl⁻, e água envolvidos na diarreia não está totalmente esclarecido. No entanto, sabe-se que há um aumento dos níveis de cálcio intracelulares, ativação de canais responsáveis pela secreção de Cl⁻ e de Na⁺, indução da síntese de prostaglandina E2 e perda das “tight-junctions”, envolvidas na manutenção dos gradientes eletroquímicos essenciais para o transporte celular dos eletrólitos.^{27,29} Para além disto, acredita-se que uma redução de aquopurinas após infeção intestinal promova a libertação de fluídos para o lúmen intestinal.³⁰ Assim, induz-se a secreção de eletrólitos e líquidos, típica da diarreia em DPD.

As toxinas LT são produzidas pela *E.coli* e permanecem associadas ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na sua superfície bacteriana. Estas enterotoxinas são compostas por uma subunidade A e 5 subunidades B, estando estas últimas envolvidas na ligação ao gangliosídeo GM1 (Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1ceramida) na superfície da mucosa intestinal. Após internalizadas, as toxinas estimulam a atividade da adenilato ciclase, promovendo a conversão de ATP a cAMP.^{28,31} Para além disto, demonstram ser um potente modulador do sistema imune, promovendo a apoptose de células T CD8+, ativação de células B e alteração da secreção de citocinas por monócitos.³² Assim, as toxinas LT promovem o aumento de cAMP, promotor da desregulação da secreção de eletrólitos, e modulam o sistema imune, proporcionando o desenvolvimento de DPD.

As toxinas termo-estáveis apresentam diferentes mecanismos de ação no desenvolvimento de DPD. A toxina STa liga-se ao recetor transmembranar de guanilato ciclase C, ativa a via de guanilato ciclase com elevação dos níveis de cGMP nas células epiteliais e consequente ativação de CFTR.²⁷ A EAST1 parece também promover o aumento dos níveis de cGMP, mas o seu papel no desenvolvimento de DPD encontra-se pouco elucidado.³³ Quanto aos mecanismos de ação da toxina STb, sabe-se que são menos dependentes da influência dos sistemas de nucleótidos cíclicos e envolvem a serotonina (5-HT) e a PGE2. A toxina STb induz o aumento dos níveis destas duas moléculas e a presença de inibidores destas reduz a indução da diarreia pela STb.³⁴ A toxina STb liga-se a um recetor de sulfatida (3-O-sulfogalactosilceramida) e após internalizada estimula uma proteína regulatória que liga GTP sensível à toxina pertussis.^{34,35} A sua ligação ao recetor leva a uma absorção de iões de cálcio para o interior dos enterócitos, induzindo a secreção de água e eletrólitos. Assim, induz-se a acumulação de Na⁺ e Cl⁻ no lúmen intestinal e também a estimulação da secreção de bicarbonato (HCO₃⁻)³⁵, promovendo-se a diarreia.

Concluindo, a ingestão e colonização de ETEC promove a produção e libertação de enterotoxinas responsáveis pela patogénese de DPD. Estas toxinas, quando internalizadas, induzem a secreção para o lúmen intestinal e reduzem a absorção para os enterócitos de iões, como o Na⁺ e o Cl⁻. Para além disto, aumenta a secreção de fluídos, por estimulação das aquopurinas ou tentativa de reequilíbrio osmótico. Em consequência, ocorre a produção de fezes aquosas e desidratação, típicas de DPD nos leitões, uma vez que estas secreções no intestino delgado excedem a capacidade de reabsorção do intestino grosso, diminuída após o desmame.

1.3. Diagnóstico

Na medicina veterinária, é importante o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico de DPD. Estas promovem a confirmação da etiologia bacteriana desta doença e o conhecimento da suscetibilidade antimicrobiana de uma estirpe bacteriana identificada. Desta forma, é possível, posteriormente, recorrer-se ao tratamento mais adequado.

O diagnóstico de DPD normalmente realiza-se pela observação dos sinais clínicos típicos desta doença como a perda de apetite e peso corporal, letargia, diarreia, desidratação severa e, possivelmente, a morte. Para além desta análise, pode-se realizar um esfregaço

rectal como forma de detecção de *E.coli*. Por outro lado, realizam-se análises genotípicas por PCR multiplex, e fenotípicas por ELISA ou por ensaio de imunofluorescência indireta (IFA).^{36,37} Estas análises promovem a confirmação de patogenicidade de isolados de *E.coli*, através da detecção de genes que codifiquem as adesinas e enterotoxinas, envolvidas na sua patogénese. Para além disto, por PCR, é possível estimar a suscetibilidade genética dos leitões para DPD, através da análise dos recetores específicos para adesinas F4 e F18.³⁷ Assim, análises genotípicas, fenotípicas, microbiológicas e dos sinais clínicos, promovem um diagnóstico eficaz da DPD.

Concluindo, o diagnóstico é crucial para se fazer um controlo adequado da doença. Este pode ser feito por análise microbiológica, genotípica, fenotípica e dos sinais clínicos de DPD. O PCR multiplex é frequentemente utilizado para detetar a presença de genes que codificam as adesinas, enterotoxinas ou dos recetores para as adesinas, analisando-se a suscetibilidade dos leitões para DPD. Por outras técnicas também se podem detetar estas adesinas, enterotoxinas e recetores para adesinas. Assim, determina-se a estirpe responsável e recorre-se ao tratamento mais adequado.

1.4. Prevenção

A DPD é uma doença multifatorial associada à infeção intestinal por ETEC. As estratégias preventivas desta doença baseiam-se no controlo das causas que predispõem para estas infeções bacterianas e na atuação ao nível do mecanismo de ação de ETEC. Desta forma, será possível diminuir a ocorrência da infeção por ETEC e/ou inibir os mecanismos de patogénese a nível intestinal nos leitões infetados.

As estratégias preventivas de DPD em leitões incluem o controlo das condições zootécnicas, o aumento da imunidade dos leitões através da vacinação, a seleção dos leitões geneticamente insuscetíveis a infeção por ETEC e/ou o aumento da idade dos leitões aquando do desmame.^{3,4} As condições zootécnicas estabelecidas devem providenciar uma alimentação adequada acessível a todos os leitões e um ambiente higiénico com conforto térmico, minimizando o stress induzido nestes animais.¹⁰ A vacinação, normalmente contra DPD originada por ETEC-F18 e ETEC-F4, ativa o sistema imunitário, com aumento de IgA no soro e diminuição da diarreia. Esta vacinação é feita utilizando vacinas de *E.coli* viva positiva para F18 ou F4 ou contendo as proteínas recombinantes de ETEC (F4 e F18), as

subunidades das adesinas purificadas envolvidas na adesão ou as próprias enterotoxinas.³⁸⁻
⁴⁰ Para além destas vacinas comercializadas, têm sido investigadas vacinas produzidas de extratos de plantas, como por exemplo a vacina oral de plantas do tabaco, que expressam uma variante da subunidade FaeG de F4.⁴¹ Apesar destas vacinas demonstrarem eficácia, são administradas pré-desmame sem se ter conhecimento da influência dos anticorpos maternos na sobrevivência da vacina a nível intestinal e são muito específicas, não protegendo contra diferentes estirpes de ETEC que produzem diferentes adesinas e enterotoxinas.

Os leitões podem ser geneticamente resistentes a ETEC-F4 e F18, caso não apresentem os genes que codificam os recetores para estas adesinas bacterianas. A seleção destes leitões resistentes é uma estratégia preventiva. No entanto, a obtenção de leitões imunes a qualquer adesina produzida por ETEC é difícil e envolve perdas económicas elevadas. Para além desta estratégia preventiva, a indústria suína muitas vezes recorre ao aumento da idade do leitão aquando do seu desmame, garantindo um trato gastrointestinal mais desenvolvido e uma maior resistência às alterações do desmame.^{3,4} Assim, tanto a seleção de leitões imunes como o aumento da idade dos leitões no desmame contribuirão para a redução da mortalidade associada à DPD.

Concluindo, a diminuição da ocorrência da infeção por ETEC e/ou a inibição dos mecanismos de patogénese a nível intestinal nos leitões infetados são estratégias preventivas de DPD. Isto é normalmente conseguido através da vacinação, do aumento da idade dos leitões aquando do desmame e/ou por melhoria das condições ambientais a que estes animais estão sujeitos. Desta forma, é possível prevenir o desenvolvimento de DPD.

1.5. Tratamento

A DPD é caracterizada por alterações no microbioma intestinal. A principal estratégia de tratamento desta doença é a manutenção do equilíbrio deste microbioma, tanto no tratamento farmacológico como no não farmacológico. A utilização de antibióticos promotores do crescimento (AGP), tais como antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e fluorquinolonas, na alimentação animal foi proibida em 2006 pela União Europeia. Esta proibição deveu-se ao risco de resistência bacteriana a estes compostos em humanos e à contaminação residual da cadeia alimentar com antibióticos, representando

perigo para a saúde pública.^{4,42} Assim, ocorreu um aumento da mortalidade por DPD e procura por formas de tratamento não farmacológico desta doença, que estimulem a microflora intestinal benéfica e minimizem as bactérias patogênicas, protegendo contra a invasão por microrganismos patogênicos.^{4,7}

1.5.1. Estratégias Terapêuticas Farmacológicas

Antes de 2006, utilizavam-se AGP na dieta dos suínos como tratamento farmacológico da DPD, mas também como forma de promover o crescimento dos animais. Atualmente, estes compostos são ainda utilizados na indústria dos suínos, mas apenas em situações de emergência, para controlo terapêutico.⁷ Estes AGP promovem a saúde intestinal por melhoria da composição da microflora intestinal dos leitões, eliminando ou reduzindo as bactérias patogênicas e promovendo o crescimento destes animais.⁴³ Ao se reduzir as infeções entéricas, espera-se promover uma proteção contra DPD e as suas consequências associadas.⁴

Na medicina veterinária existem diversos AGP utilizados no controlo de colibacilose entérica em suínos. Estes incluem os antibióticos β -lactâmicos (penicilina, cefalosporinas (ceftiofur e cefquinoma) e amoxicilina, muitas vezes combinada com o ácido clavulânico) e os aminoglicosídeos (apramicina, neomicina, gentamicina) e aminociclítóis (espectinomicina). Para além destes, existem ainda as sulfonamidas combinadas com as diaminopirimidinas (sulfametoxazole/trimetoprim), fluorquinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina e danofloxacina), quinolonas (flumequina) e polimixinas (sulfato de colistina).^{42,44} Os antibióticos β -lactâmicos interferem com a formação da parede celular bacteriana, através da ligação a proteínas que ligam penicilina (PBPs), inibindo a síntese do peptidoglicano.⁴⁵ Os antibióticos aminoglicosídeos demonstram ter um efeito bactericida direto nas bactérias gram-negativas como a *E.coli*.⁴⁶ As sulfonamidas e o trimetoprim inibem a síntese de ácido fólico e, conseqüentemente, das purinas requeridas para a síntese de DNA bacteriano. As fluorquinolonas e quinolonas são inibidores de enzimas envolvidas na replicação do DNA bacteriano. Por outro lado, a colistina liga-se ao LPS e aos fosfolípidos na membrana externa de bactérias Gram-negativas, resultando no aumento da permeabilidade do envelope celular e, conseqüentemente, na morte celular.⁴⁷ Assim, qualquer um destes compostos atua como antimicrobiano, minimizando a subseqüente

adesão bacteriana intestinal e libertação de enterotoxinas, mas não atua nas enterotoxinas já existentes no intestino, promotoras de diarreia.

Concluindo, os AGP são utilizados graças ao seu efeito antimicrobiano. Estes promovem a morte celular bacteriana através de distúrbios na replicação do DNA e na estabilidade da membrana externa bacteriana, atuando diretamente nesta ou interferindo na síntese de peptidoglicano. Desta forma, diminui-se a colonização bacteriana intestinal e a incidência de DPD.

1.5.2. Estratégias Terapêuticas Não Farmacológicas

Após a proibição do uso de AGP nas rações animais tornou-se imperativo encontrar alternativas aos antibióticos na dieta. Têm sido propostas diversas alternativas promovendo a manutenção da saúde intestinal e a performance animal.^{4,7,48} Estes compostos incluem os prebióticos, os probióticos, os simbióticos, os ácidos orgânicos e o óxido de zinco. Para além destes, existe ainda referência às enzimas exógenas, aos minerais de argila, aos bacteriófagos, aos anticorpos e às proteínas do plasma seco por pulverização (SDP), aos péptidos antimicrobianos e aos nucleótidos.^{4,48} A adição destes compostos à dieta animal espera promover a redução da incidência e severidade da diarreia após o desmame nos leitões.⁴⁸

1.5.2.1. Prebióticos

Os prebióticos são hidratos de carbono da dieta fermentados seletivamente, que promovem alterações na composição e/ou na atividade microbiana, conferindo benefícios para o bem-estar e saúde.^{20,49} Estes compostos têm de resistir à acidez gástrica, à hidrólise enzimática e à absorção no trato gastrointestinal e ser fermentados pelo microbioma intestinal. Os prebióticos incluem os frutooligossacarídeos (FOS), os transgalactooligossacarídeos (TOS), os galactooligossacarídeos (GOS), os oligossacarídeos da soja, os mananooligossacarídeos (MOS), xilooligossacarídeos (XOS), a lactulose e a inulina.⁴⁹⁻⁵¹ Para além destes, a lactose também é considerada prebiótico nesta fase do desenvolvimento suíno, graças à diminuição da atividade da lactase após o desmame dos

leitões.⁵² Após a administração dos prebióticos pelos leitões, espera-se que estes estimulem seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias intestinais benéficas, associadas à saúde e ao bem-estar animal. Para além disto, minimizem a adesão de ETEC ao epitélio intestinal e a inflamação induzida por esta, estimulem o sistema imune local e melhorem a digestibilidade dos nutrientes e o crescimento e a morfologia intestinal dos leitões.^{7,49}

A adição dos prebióticos à dieta animal estimula a produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) e a proliferação e/ou a atividade de bactérias benéficas intestinais, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* e Eubactéria.⁵³ Os FOS promoveram a proliferação de *Bifidobacterium*⁵¹, enquanto que MOS promoveram o aumento das populações de *B. longum*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* e redução das populações patogénicas de *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium botulinum* e *C. sporogenes*.⁵⁴ Os GOS, FOS e oligossacarídeos da soja aumentam o número de bactérias dos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no intestino e a concentração de SCFA⁵⁵ e diminuem *Bacteroides*, *Clostridia* e *Fusobacteria* fecais nos suínos.⁵⁶ A lactulose, formada pela isomerização da lactose, é fermentada no intestino grosso e promove o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e redução da atividade de bactérias proteolíticas.⁵² A inulina, obtida principalmente a partir de chicória, estimula a microflora intestinal com aumento da população de *Bifidobacteria*, mas não de *Lactobacilli*, e aumento da produção de SCFA.⁵⁷ A lactose também demonstra favorecer as populações de *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*, diminuindo as de *E.coli*.^{52,58} Este efeito dos prebióticos na alteração do microbioma intestinal promove ainda alterações nos níveis de amónia, ácido láctico e acético e butirato no intestino e/ou fezes, produzidos pelas bactérias benéficas. Após a administração de GOS e FOS, verificou-se um aumento da produção de lactato e acetato.^{51,56} Após a fermentação da lactulose no intestino grosso, esta induziu a produção de ácido láctico, butírico e/ou acético e diminuiu a libertação de amónia nas fezes. Desta forma, os prebióticos promovem a alteração do pH intestinal, como se verificou após a administração de FOS e TOS no íleo mas não a nível fecal.^{52,56} Assim, estes compostos demonstram promover uma melhoria da composição do microbioma intestinal, com aumento das bactérias benéficas e dos produtos da sua fermentação.

Os prebióticos minimizam a adesão de bactérias patogénicas ao epitélio intestinal, estimulam o sistema imune local, diminuem a inflamação induzida por ETEC e melhoram o crescimento dos leitões, a digestibilidade dos nutrientes e a morfologia do intestino delgado.⁵⁶ A inibição da adesão de ETEC é promovida após administração de MOS e β -

galactomananas.⁵⁹ Adicionalmente, sabe-se que a suplementação dos animais com MOS aumenta a atividade de macrófagos e linfócitos-T.⁶⁰ Existem também evidências de que as β -galactomananas promoveram a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, GM-CSF e quimiocinas.⁵⁹ Diversos estudos demonstraram que, após a administração de FOS, TOS e MOS, se verifica uma melhoria significativa no crescimento dos leitões.^{60,61} Efetivamente, a suplementação dos leitões com GOS, FOS, oligossacarídeos da soja, inulina ou lactose induziu melhoria na morfologia do intestino delgado, com aumento da altura das vilosidades intestinais, e na performance destes animais.^{55,58} Apesar destes resultados promissores dos prebióticos, existem alguns resultados contraditórios na literatura, como a ausência da sua influência no pH intestinal e de melhoria da performance dos animais e do balanço microbiano intestinal.^{62,63} No entanto, estes podem ser explicados por diferenças no tipo e dose de prebiótico, nas técnicas utilizadas, na idade dos animais e nas dietas às quais foram adicionados estes compostos.⁶³ Assim, acredita-se que a adição de prebióticos à dieta dos leitões promova melhoria da morfologia e crescimento dos leitões e diminuição da inflamação e adesão bacteriana, reduzindo a incidência de DPD.

Concluindo, a suplementação dos leitões com prebióticos demonstra melhorar o microbioma intestinal dos leitões, com aumento das bactérias benéficas e diminuição das patogênicas. Para além disto, parece promover o sistema imune e o crescimento dos animais, melhorar a sua morfologia intestinal e diminuir a inflamação e adesão de ETEC intestinal, reduzindo a ocorrência de DPD nos leitões. Todavia, a existência de alguns resultados contraditórios na literatura, cria a necessidade de avaliação da influência de vários parâmetros, como o tipo de prebiótico e a dose e as técnicas utilizadas, nos resultados obtidos e uniformizar as condições de avaliação dos prebióticos. Assim, promove-se a comparação entre diferentes prebióticos, um melhor entendimento do seu potencial terapêutico e a escolha de uma forma mais eficaz de tratamento da DPD.

1.5.2.2. Probióticos

Os probióticos são alimentos funcionais contendo microrganismos viáveis definidos num número suficiente, que alteram o microbioma intestinal do hospedeiro, promovendo efeitos benéficos para o organismo e a saúde animal.^{4,64} Estes microrganismos têm de ser capazes de se tornar parte da população bacteriana comensal do hospedeiro, aderir

livremente à mucosa intestinal e sobreviver ao ambiente ácido gástrico (pH 2.0-2.5) e aos sais biliares. Para além disto, têm de apresentar uma gama de mecanismos para competir e superar as bactérias patogénicas, promovendo a redução de infeções intestinais. O efeito dos probióticos pode ser potenciado com administração destes pré-desmame e de forma prolongada.^{65,66} Com a suplementação dos leitões com os probióticos espera-se uma redução da ocorrência de distúrbios intestinais e da mortalidade na fase pós-desmame, diminuindo a incidência de DPD.

As três categorias de microrganismos mais comumente utilizados como probióticos são os *Bacillus*, as bactérias produtoras de ácido láctico como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, as leveduras e estirpes de *E. coli* não patogénicas sem genes de virulência.^{66,67} A suplementação com *L. rhamnosus*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus* K7, *E. faecium*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, quatro espécies de *Lactobacillus*, *E. faecium*, *Saccharomyces cerevisiae* e *E.coli* Nissle 1917 reduziu a incidência de diarreia e a taxa de mortalidade de leitões desmamados com DPD causada por ETEC.⁶⁷⁻⁷¹ Estes compostos bioativos promovem o crescimento e a performance dos leitões. Estudos demonstraram que membros do género *Bacillus* induzem melhoria do crescimento nos leitões desmamados⁷², mas não após aplicação de *B. toyoi*.⁷³ Por outro lado, a adição de *E. faecium* à dieta dos animais aumentou a performance dos leitões.^{58,68,71} As culturas de leveduras, quando adicionadas à dieta destes animais, promovem melhoria da performance do crescimento e da saúde intestinal destes em alguns estudos.⁷⁴ Com a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* induz-se melhoria na performance do crescimento pós-desmame.^{74,75} Assim, a suplementação dos leitões com probióticos promove o crescimento dos animais e a redução da incidência de DPD.

Os probióticos, quando inseridos na alimentação dos leitões, têm efeitos benéficos manifestados no balanço microbiano intestinal, com diminuição dos níveis de microrganismos patogénicos, e na integridade do epitélio intestinal. Para além disto, promovem a maturação apropriada dos tecidos associados ao trato digestivo e das suas funções neuroendócrinas, promovendo a exclusão competitiva de bactérias patogénicas.⁶⁴ A suplementação dos leitões com membros do género *Bacillus* reduziu o número de *Enterococci*, *Bacteroides* e coliformes intestinais, e a severidade da diarreia causada por *E. coli*, enquanto que a adição na dieta de *Lactobacillus acidophilus* promoveu uma diminuição de *E. coli* e aumento de *Lactobacillus* intestinal.^{72,76,77} Ainda, a administração aos leitões de

Lactobacillus K7 reduziu o número de *E. coli* e a severidade dos sintomas clínicos de DPD.⁷⁸ Para além da alteração do microbioma intestinal, a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* induziu melhoria na altura das vilosidades e na proliferação das células epiteliais.^{59,74} A melhoria da integridade e da função da mucosa intestinal foi também conseguida com *Lactobacillus plantarum* e uma mistura de *B. licheniformis* e *B. subtilis*.^{67,73} Por outro lado, a adição de *E.coli* Nissle 1917 na dieta dos leitões reduziu a secreção de cloreto e eliminou a permeabilidade paracelular⁷⁰. Assim, a suplementação dos leitões com probióticos promove o balanço microbiano intestinal e a integridade estrutural e funcional do epitélio intestinal, reduzindo a incidência de DPD.

Os probióticos induzem a diminuição das populações de microrganismos patogénicos, como *Salmonella* e *E. coli*, por exclusão competitiva e por produção de ácidos orgânicos, com diminuição do pH, e compostos como bactericinas, com efeito semelhante aos antibióticos.^{64,79} Esta diminuição do número de microrganismos patogénicos reduz a sua subsequente adesão à mucosa intestinal. Estudos revelam que a suplementação dos leitões com *L. sobrius* 001T contra ETEC K88 induz melhorias no ganho de peso corporal e reduz a abundância de ETEC no íleo, no entanto não reduz a diarreia.⁷⁹ A adição na dieta dos animais de uma estirpe de *Enterococcus faecium* ou da estirpe 104R de *Lactobacillus fermentum* inibiu a adesão de ETEC K88 à mucosa do intestino delgado dos leitões.^{80,81} Adicionalmente, a adesão à mucosa do íleo de ETEC:F4 foi reduzida após administração de uma mistura de probióticos de *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, comparativamente ao tratamento farmacológico com clorotetraciclina e tiamulina.⁸² Assim, os probióticos promovem a redução de ETEC e a sua adesão intestinal, reduzindo a incidência de DPD.

Os probióticos promovem um aumento da atividade de enzimas probióticas microbianas e da digestibilidade dos alimentos, a estimulação do sistema imune, com aumento da produção de imunoglobulinas e da atividade de macrófagos e células NK, e regulação da inflamação.^{77,83} A suplementação dos leitões com *Bifidobacterium lactis* HN019 induziu respostas imunes celulares como a fagocitose e respostas linfoproliferativas, e aumentou a quantidade de anticorpos específicos contra microrganismos patogénicos intestinais.⁸⁴ A suplementação com leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* spp. *boulardii*, aumentou o número de macrófagos ao longo do intestino delgado dos animais.⁷⁵ Relativamente à adição da dieta de *E. coli* Nissle 1917, esta aumentou a densidade de células

T citotóxicas (CD8+), sem influenciar a distribuição e o número dos péptidos antimicrobianos.⁸⁵ No entanto, o probiótico *Enterococcus faecium* promoveu a diminuição dos níveis de IgG e do nível de células T CD8+ no epitélio do jejuno destes animais.⁸⁶ A suplementação dos leitões com *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium animalis* MB5 reduziu a inflamação, com redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e inibição da transmigração de neutrófilos, e a diarreia.⁸⁷ Assim, os probióticos quando adicionados na dieta dos leitões vão promover redução da inflamação e estimulação do sistema imune do animal, promovendo a redução da incidência de DPD.

Concluindo, os probióticos demonstram ser aditivos alimentares interessantes no desenvolvimento de uma formulação para tratamento não farmacológica de DPD. Estes promovem a manutenção do equilíbrio da microflora intestinal, a melhoria da integridade estrutural e funcional intestinal, a estimulação do sistema imune do animal e a redução da inflamação induzida pela infecção por ETEC. Para além disto, promovem o crescimento e a performance dos animais e reduzem a incidência de diarreia e a taxa de mortalidade de leitões desmamados com DPD causada por ETEC. Na literatura existem alguns resultados contraditórios,^{64,66,88,89} mas estes podem ser explicados por diferenças no tipo, na dosagem e na estabilidade dos probióticos utilizados, no ambiente sanitário a que os animais estão sujeitos e na idade e predisposição genética para DPD dos leitões. Para além disto, existe ainda a influência de diferentes condições de armazenamento, tecnologia e matriz alimentar, onde os probióticos são inseridos, no efeito dos probióticos.^{74,90} Assim, estes compostos bioativos demonstram impedir a proliferação de microrganismos patogénicos como ETEC e, conseqüentemente, reduzir a incidência de DPD. Pesquisas futuras devem ser feitas avaliando a influência do tipo e dosagem de probiótico nos resultados e identificando quais as condições que promovem de forma consistente a saúde intestinal e melhoram a performance dos leitões na fase pós-desmame.

1.5.2.3. Simbióticos

Os simbióticos refletem uma combinação das abordagens dos probióticos e dos prebióticos, podendo-se basear num efeito complementar ou sinérgico destes dois. Os simbióticos complementares apresentam estes dois constituintes escolhidos de forma independente, conferindo os seus efeitos benéficos para o hospedeiro. Os simbióticos

sinérgicos contêm um prebiótico selecionado especificamente para induzir o probiótico presente nesse simbiótico, intensificando os seus efeitos intestinais.^{64,91} Desta forma, espera-se que a combinação de prebióticos e probióticos potencie o efeito intestinal, induzindo redução da incidência de DPD.

Existem diversas combinações de prebióticos e probióticos que promovem o desenvolvimento e a saúde intestinal dos leitões desmamados. A administração de *L. paracasei* ou *E. faecium* com maltodextrinas⁹², de *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. salivarius* ou *E. faecium* com lactulose ou lactitol⁹³, *L. paracasei* com FOS⁹⁴ e *B. anomalis* subsp. *Lactis* com FOS⁹⁵, promoveu a alteração do microbioma intestinal. Estas combinações de prebióticos e probióticos reduziram os patogênicos, como *E. coli*, coliformes e bactérias dos gêneros *Enterobacteriaceae* e *Clostridium*, e induziram a proliferação de bactérias benéficas do gênero *Bifidobacteria*.⁹²⁻⁹⁴ Para além disto, verificou-se uma redução da adesão de *E. coli* patogénica à mucosa intestinal, melhoria da morfologia intestinal e do crescimento dos leitões e redução da incidência de DPD.⁹²⁻⁹⁵ Desta forma, os simbióticos demonstram ter elevada eficácia na melhoria da saúde intestinal dos leitões, que pode ser potenciada com a administração destes compostos na fase pré-desmame.⁶⁴

Assim, a combinação de prebióticos com probióticos também é uma alternativa eficaz para o controlo de DPD, principalmente quando se administra aos leitões simbióticos sinérgicos. Estes potenciam os efeitos dos prebióticos e probióticos a nível intestinal no leitão. Com a manutenção de um equilíbrio saudável da microflora intestinal, minimiza-se a incidência de DPD nos leitões na fase pós-desmame.

1.5.2.4. Ácidos orgânicos

No desmame, a gama de pH gástrico nos leitões varia de 2,6 a 5,0, enquanto que num suíno maduro esta é de 2.0-3.0.⁹⁶ A manutenção de valores baixos de pH no estômago é importante para otimizar a digestão e absorção dos nutrientes e promover o crescimento e a saúde intestinal destes animais.^{4,97-99} O efeito bactericida dos ácidos orgânicos manifesta-se por dois mecanismos: a redução do pH no estômago e no intestino delgado, inibindo indiretamente o crescimento de microrganismos patogênicos, e os seus efeitos bactericidas diretos intestinais.^{99,100} Tipicamente, os ácidos orgânicos de cadeia curta (ácidos acético, fórmico, propiónico e láctico) têm a capacidade de se difundir pela membrana celular das

bactérias na forma não dissociada (RCOOH). No interior das bactérias dissociam-se em prótons H^+ e aniões $RCOO^-$, perturbando o pH e a “pool” de aniões no citoplasma destas e induzindo a morte celular.^{97,100} A diminuição do pH desnatura enzimas e põe em causa a integridade das bases de purinas, impedindo a replicação do DNA bacteriano, enquanto que a elevada concentração de aniões induz uma pressão de turgor intracelular.^{100,101} O efeito bactericida destes compostos é potenciado na presença de um conjunto de diferentes ácidos orgânicos com diferentes valores de pKa, uma vez que este efeito depende da razão entre o ácido dissociado e não dissociado.¹⁰¹ Assim, ocorre uma promoção da saúde intestinal dos leitões com DPD, suplementados com ácidos orgânicos, graças ao aumento da acidez gastrointestinal, pela presença da sua forma dissociada, e/ou ao efeito bactericida direto intestinal da sua forma não dissociada.

Os ácidos orgânicos utilizados na terapêutica da DPD incluem os ácidos fórmico (pKa 3,75), fumárico (pKa 3.02 e 4.38), cítrico (pKa 3.13, 4.76 e 6.4), láctico (pKa 3,83), benzóico (pKa 4.21), propiónico (pKa 4.88) e sórbico (pKa 4.76).⁹⁶ Os seus efeitos benéficos incluem a melhoria da morfologia intestinal e da digestibilidade dos nutrientes e as alterações no microbioma gastrointestinal. Estas alterações na microflora intestinal refletem a diminuição de bactérias patogénicas, como *E.coli*, *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, e aumento de bactérias benéficas, como *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp*.^{99,102} A suplementação de ácido fórmico e láctico melhorou a digestibilidade dos nutrientes e inibiu o crescimento de *E. coli*.¹⁰² Este efeito foi menos pronunciado na presença dos ácidos acético e propiónico.⁹⁷ O efeito antimicrobiano do ácido fórmico foi ainda potenciado, quando combinado com ácido sórbico, fumárico,¹⁰³ cítrico, propiónico e benzoico.⁹⁷ Estes efeitos do ácido fórmico são similares ou superiores aos obtidos com tratamento farmacológico. Por outro lado, a suplementação dos leitões com ácido benzóico reduziu tanto bactérias gram-negativas como bactérias de ácido láctico.¹⁰⁴ A suplementação de 75% de ácido fórmico e 25% de ácido propiónico na dieta, induziu diminuição da contagem de *Salmonella* e *E.coli* no estômago dos leitões infetados.¹⁰⁵ Ainda, a adição de ácido glucónico demonstrou efeitos benéficos na microflora intestinal, morfologia das vilosidades intestinais e condição geral de saúde dos leitões.⁹⁶ Por fim, a suplementação de uma combinação dos ácidos fórmico, fumárico, láctico, benzoico e sórbico suprimiu as populações intestinais de *E.coli*, *Salmonella* e *Enterococcus*.^{104,106} Assim, a adição à dieta dos leitões de ácidos orgânicos promove a manutenção do equilíbrio do microbioma intestinal e melhoria da morfologia intestinal,

podendo melhorar a saúde intestinal geral dos leitões com DPD e a redução da incidência desta doença nestes animais.

Os ácidos orgânicos potenciam a imunidade no epitélio intestinal e induzem o crescimento e a performance dos leitões na fase pós-desmame,⁹⁶ demonstrando redução da incidência e da severidade da diarreia nos leitões.¹⁰¹ O ácido fumárico demonstra minimizar a DPD causada por ETEC em leitões.¹⁰⁷ A suplementação com ácido fórmico aumenta a eficiência do crescimento nos suínos, que é potenciada pela sua combinação com sorbato de potássio.¹⁰⁸ A combinação de ácidos fumárico, cítrico e málico (pKa 3.4 e 5.13) induziu um aumento do crescimento, do consumo alimentar e da condição geral de saúde dos leitões.⁹⁶ Adicionalmente, a suplementação combinada dos ácidos fórmico, fumárico, láctico, benzoico e sórbico melhora a eficiência do crescimento dos leitões.^{104,106} Assim, a administração de ácidos orgânicos pelos leitões com DPD induz melhorias no seu crescimento e performance geral.

Concluindo, a acidificação do ambiente gastrointestinal após administração de ácidos orgânicos promove a melhoria da performance e da saúde gastrointestinal nos leitões. Isto deve-se à diminuição do pH gastrointestinal, que potencia a digestibilidade dos nutrientes e alteração da microflora intestinal, e à ação bactericida direta intestinal, promovendo a morte celular. Na literatura também existem resultados contraditórios a estes,¹⁰⁹ que podem ser explicados pela influência do pH, da dosagem e tipo de ácidos orgânicos, da idade do animal e do processamento da dieta onde estes estão inseridos no efeito destes compostos.^{100,106} A administração aos leitões de uma combinação de diferentes ácidos orgânicos, com diferentes valores de pKa, proporcionará a presença ao longo do trato gastrointestinal tanto da forma dissociada como não dissociada destes compostos e, assim, contribuirá para a redução da incidência de DPD nos leitões.

1.5.2.5. Óxido de Zinco

O zinco (Zn) é um mineral essencial importante para o crescimento e a atividade de várias enzimas do organismo, desempenhando um papel central nos processos bioquímicos do organismo animal.^{110,111} A suplementação dos leitões com Zn, na forma de óxido de zinco (ZnO), é feita em doses farmacológicas (2500-3000 ppm) e apenas nas duas primeiras

semanas pós-desmame.¹¹⁰ Este, quando adicionado às dietas dos leitões, parece promover o crescimento animal e reduzir a incidência de DPD e a mortalidade dos leitões.^{110,112}

O mecanismo de ação do ZnO não está completamente conhecido. No entanto, estudos revelam uma intervenção nos mecanismos de defesa do animal, como o aumento da expressão genética de péptidos antimicrobianos intestinais. Para além disto, verifica-se alteração do microbioma intestinal, com manutenção da sua estabilidade e diversidade e diminuição de microrganismos patogénicos, como os coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Aeromonas hydrophilia*.¹¹⁰⁻¹¹² Quanto ao efeito do ZnO no microbioma intestinal, existe alguma controvérsia nos resultados, em que alguns estudos demonstram redução da população de bactérias benéficas e aumento das patogénicas, como coliformes e *Enterococci*.¹¹² Os efeitos bactericidas do ZnO podem dever-se à penetração do peróxido de hidrogénio, gerado na superfície deste composto, através da membrana celular bacteriana, inibindo o crescimento celular. O ZnO induz, ainda, aumento da expressão intestinal de IGF-I e IGF-II¹¹¹, redução da inflamação, melhoria da morfologia intestinal, inibição da adesão bacteriana intestinal e diminuição da secreção de eletrólitos pelos enterócitos.¹¹²⁻¹¹⁵ O aumento da expressão de IGF-I e do seu recetor (IGF-IR) induz a produção de mucina, a digestão e absorção de nutrientes e o desenvolvimento intestinal.¹¹¹ Assim, a administração de ZnO aos leitões promove a saúde intestinal e o crescimento animal, estimula o sistema imune dos leitões e reduz a inflamação intestinal, reduzindo a incidência e severidade de DPD.

Concluindo, a administração de 2500-3000 ppm de óxido zinco protege contra DPD nos leitões desmamados, induzindo respostas imunes, minimizando respostas inflamatórias e melhorando a morfologia e o microbioma intestinal. Apesar dos seus efeitos promissores no tratamento de DPD, a sua utilização na nutrição animal ter vindo a diminuir.¹¹⁶ Esta diminuição deve-se à poluição ambiental subjacente ao uso de elevadas quantidades de ZnO, por contaminação do solo com metais pesados,¹¹⁶ e à recomendação de utilização de apenas 100 mg/kg de Zn na dieta dos leitões nesta fase (NRC 1998). Tendo isto em conta, muitas vezes recorre-se à combinação do ZnO com outros aditivos não farmacológicos como os óleos essenciais e MOS/FOS ou à utilização de outras fontes de Zn, como a metionina de zinco (ZnM). Esta exerce também efeitos benéficos para menores quantidades de composto.¹¹⁷ Assim, é necessário o desenvolvimento de outras alternativas ao ZnO, graças às preocupações ambientais associadas à sua elevada administração.

1.5.2.6. Outros compostos

A saúde intestinal dos suínos com DPD na fase pós-desmame pode ser melhorada com outros aditivos para além dos prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e do óxido de zinco. Existem resultados que demonstram o potencial de outros compostos na melhoria da morfologia intestinal, promoção do crescimento do animal e redução da incidência e severidade da DPD nos leitões desmamados.¹¹⁸⁻¹³¹ No entanto, o conhecimento dos seus mecanismos de ação é ainda limitado. Assim, estes compostos serão também mencionados, por demonstrarem potencial na melhoria da saúde intestinal e na redução da incidência de DPD.

A suplementação dos leitões na fase pós-desmame com um conjunto de produtos, incluindo enzimas exógenas, extratos naturais, minerais de argila, bacteriófagos, anticorpos e plasma seco por pulverização (SDP), péptidos antimicrobianos, e nucleótidos, tem demonstrado promover a redução da incidência de DPD.¹¹⁸⁻¹³¹ A adição na dieta dos leitões de enzimas exógenas, como proteases, fitases e carboidratases, melhora a digestibilidade dos nutrientes.^{121,122} Os extratos naturais do alho, tomilho, orégão, cravo, canela e zimbro são muitas vezes combinados com os ácidos orgânicos por apresentarem compostos com propriedades antimicrobianas, provocando dano na parede bacteriana.¹²³⁻¹²⁵ Os minerais de argila apresentam capacidades de sorção elevadas, promovendo a absorção de água, diminuição da velocidade de passagem digestiva pelos intestinos e adsorção de patogénicos e enterotoxinas.¹²⁶⁻¹²⁹ Os bacteriófagos apresentam um efeito bactericida específico para algumas espécies de bactérias, promovendo a saúde intestinal dos leitões.¹³⁰ A administração de anticorpos específicos contra os patogénicos responsáveis pela DPD¹³¹ e proteínas do plasma seco por pulverização (SDP)¹¹⁸ pelos leitões induz imunização passiva destes animais. Ainda, a suplementação dos leitões com péptidos antimicrobianos estimula o sistema imune destes animais.¹¹⁹ Por fim, a administração de nucleótidos em situações de stress, como a fase pós-desmame, promove o desenvolvimento gastrointestinal e imunitário do animal.¹²⁰ Assim, a suplementação dos leitões com estes aditivos estimula a saúde intestinal e geral dos leitões com DPD.

Os leitões na fase pós-desmame apresentam uma depressão no seu crescimento, com baixa ingestão alimentar e baixa digestibilidade dos nutrientes. A suplementação dos leitões nesta fase com glucose e adoçantes (sacarina e a neohespiridina dihidrocalcona (NHDC)),

melhora a absorção de açúcares, via cotransportador de Na⁺/Glucose (SGLT1), a obtenção de energia e a palatabilidade das rações.^{132,133} Assim, o desenvolvimento de uma formulação contendo glucose e adoçantes alimentares induzirá aumento da ingestão alimentar e do crescimento e performance dos animais suplementados com esta.

Concluindo, a suplementação dos leitões desmamados com prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e/ou óxido de zinco induz uma redução da incidência de DPD e dos seus sintomas nos leitões. Para além destes, existem ainda as enzimas exógenas, os extratos naturais, os minerais de argila, os bacteriófagos, os anticorpos e plasma seco por pulverização (SDP), os péptidos antimicrobianos, os nucleótidos, a glucose e os adoçantes. Estes aditivos alimentares promovem a digestibilidade dos nutrientes e a saúde intestinal e estimulam o sistema imune e o crescimento dos leitões, tornando-se interessante a sua introdução em formulações não farmacológicas para tratamento de DPD. Atualmente, existem vários produtos disponíveis comercialmente recorrendo a estes aditivos, incluindo produtos para suínos contendo amilases, xilanases e β -glucanases (Amylofeed)¹³⁴, xilanases (Ronozyme WX), fitases (Ronozyme HiPhos) e proteases (Ronozyme ProAct).¹³⁵ Para além destes, existem produtos combinando ácidos orgânicos e óleos essenciais (Acidal NC e Biotronic). Existem, ainda, produtos com enzimas exógenas e anticorpos adicionados a soluções de reidratação oral, com sais, glucose e adoçantes (Pedialyte), para tratar a diarreia e a desidratação. Assim, combinando estes vários aditivos, com diferentes mecanismos de ação, é possível obter produtos promissores para o tratamento de DPD sem recorrer a antibióticos, reduzindo o perigo subjacente para a saúde pública.

2. Desenvolvimento e estabilidade de formulações para uso veterinário

O desenvolvimento de uma formulação veterinária consiste na combinação de diferentes substâncias químicas, incluindo os compostos ativos e os excipientes, para produzir um produto final medicinal estável e aceitável para o animal.¹³⁶ A introdução deste produto no mercado está sujeita à sua avaliação farmacêutica. Esta avaliação é feita em respeito pelas Normas Orientadoras e Legislação nacional em vigor, descritas pela Direção Geral de Veterinária (DGV) e pelo instituto nacional da farmácia e do medicamento (INFARMED). Esta legislação nacional abrange as diretrizes de desenvolvimento de um

novo produto veterinário e de estudos de estabilidade ao longo da sua validade a nível europeu, segundo a agência medicinal europeia (EMA), a VICH e a farmacopeia europeia.¹³⁶⁻¹⁴⁶ Caso os estudos não sigam estas diretrizes oficiais, devem ser validados em termos de especificidade, precisão e linearidade, incluindo a estes os respetivos limites de deteção/quantificação das substâncias ativas e/ou excipientes.¹³⁷ Assim, assegura-se o cumprimento das exigências de qualidade física, química, organolética e microbiológica de qualquer produto passível de ser comercializado.

O desenvolvimento de um novo produto medicinal veterinário envolve a caracterização físico-química dos compostos ativos e da formulação final, a escolha dos excipientes e a avaliação da compatibilidade entre estes últimos e as substâncias ativas.¹³⁶ Os excipientes promovem a preparação e estabilidade do produto e a sua aceitabilidade pelos animais. Para além disto, estas substâncias podem promover a biodisponibilidade dos compostos ativos do produto.¹³⁶ Desta forma, os excipientes atuam como agentes de diluição, estabilizantes (ex. conservantes antimicrobianos e antioxidantes) e promotores da palatabilidade (ex. edulcorantes), aparência (ex. agentes de coloração) e odor (agentes aromatizantes). Estes podem, ainda, atuar como promotores da solubilidade e permeabilidade da formulação (ex. fosfolípidos), facilitando a absorção ou modificando a viscosidade (ex. carregenanas e goma de xantanas). A escolha destes compostos depende do seu papel na formulação.^{136,138,140,141} Assim, é possível desenvolver uma formulação com potencial medicinal veterinário, baseado nas substâncias ativas presentes, e aumentar este potencial e a estabilidade do produto através da escolha inteligente dos excipientes.

A comercialização de um novo produto medicinal veterinário carece da realização de estudos de estabilidade ao longo do seu desenvolvimento e no produto final. Estes estudos preveem a validade do produto e as condições de armazenamento apropriadas e sugerem instruções de rotulagem.^{139,142-144} Estas determinações são conseguidas analisando o efeito de uma variedade de fatores na qualidade físico-química e microbiológica da formulação.^{139,142-144} Estes fatores incluem as condições climáticas de humidade, temperatura e luz, a possível migração de compostos da embalagem para a formulação ou vice-versa, o pH e a solubilidade e permeabilidade, influenciando a biodisponibilidade das substâncias ativas.^{139,142-145} Podem, ainda, ocorrer reações de degradação da formulação, como oxidação, redução, hidrólise e racemização, originando produtos de degradação e perda da disponibilidade dos compostos ativos do produto.^{139,142,146} O conhecimento da

influência destes fatores na estabilidade e no potencial veterinário do produto permite prever e minimizar possíveis alterações indesejáveis neste durante o seu armazenamento.

Os estudos de estabilidade monitorizam parâmetros físicos, químicos e microbiológicos apropriados para uma dada formulação, tendo em conta as possíveis alterações físico-químicas e microbiológicas que esta poderá sofrer durante o seu armazenamento. Os parâmetros físicos incluem a cor, a claridade, o odor, a consistência, a integridade, a presença de matéria particular, o tamanho das partículas, as propriedades reológicas, a dissolução e a dispersibilidade. Os parâmetros químicos incluem o pH e as concentrações de substância ativa, de conservantes químicos e de produtos de degradação. Por último, a avaliação microbiana envolve a determinação da contagem viável total e da eficiência dos conservantes antimicrobianos.^{136,139,142-146} Assim, a minimização de alterações nestes parâmetros garante a qualidade do produto medicinal e a sua aceitabilidade pelo animal.

Os estudos de estabilidade incluem os estudos de estabilidade de longa duração e os estudos de estabilidade acelerados.^{139,142-144} Também podem-se realizar testes intermédios, sob condições menos agressivas que as verificadas nos testes acelerados. Os estudos de estabilidade de longa duração investigam a estabilidade do produto sob condições reais propostas para o seu armazenamento (ver tabela 1). Estes estudos promovem a determinação de alterações no produto ao longo do seu armazenamento e a sua data de expiração, tempo além do qual o seu consumo já não é recomendado.^{139,142-144} Os estudos de estabilidade acelerados são realizados em condições propícias à degradação da formulação, a temperatura e/ou humidade elevadas (ver tabela 1). Desta forma, estes promovem a determinação de produtos de degradação formados sob condições adversas durante o armazenamento e dos seus mecanismos de degradação.¹⁴⁶ Para além da temperatura e humidade, as condições de stress aplicadas nestes testes são a luz (estudos de fotoestabilidade²⁹¹), a agitação, a gravidade, o pH e a alteração da orientação da embalagem.^{139,142-145} Adicionalmente, promove-se a oxidação e a hidrólise ácida e básica da formulação.¹⁴⁶ Assim, torna-se possível o conhecimento dos fatores que afetam a estabilidade de um produto, não só em condições normais de armazenamento, como também em condições adversas.

Concluindo, para a comercialização de um produto farmacêutico é necessário preparar uma formulação estável físico-quimicamente e microbiologicamente. Visando esse

objetivo, é necessário desenvolver a formulação e garantir a sua estabilidade através de estudos de estabilidade de longa duração e acelerados. A realização destes estudos promove o conhecimento dos fatores que afetam a estabilidade do produto aquando do seu armazenamento e a escolha de excipientes mais apropriados para garantir essa estabilidade. Assim, é possível prever a validade do produto e garantir o seu consumo seguro pelos animais durante esse tempo.

Tabela 1- Condições de armazenamento para estudos de estabilidade térmica e sensibilidade à humidade de produtos, com comercialização em zonas climáticas I e II, pertencentes às comunidades europeias, segundo as diretrizes VICH GL3.

Estudo	Condição de armazenamento	Período de tempo mínimo (meses)
Longa duração	25°C±2°C/60%RH±5%RH ou 30°C±2°C/65%RH±5%RH	* 12/6
Intermédio**	30°C±2°C/65%RH±5%RH	6
Acelerado	40°C±2°C/75%RH±5%RH	6

*O tempo dos estudos de longa duração depende se a formulação inclui compostos descritos na farmacopeia europeia (6 meses) ou novos compostos não descritos (12 meses)

**Se os estudos de longa duração foram realizados a 30°C±2°C/65%RH±5%RH, não existem estudos intermédios.

3. Conclusão

Os leitões no desmame estão sujeitos a stress nutricional, ambiental e social e apresentam um trato gastrointestinal e um sistema imune em fase inicial de desenvolvimento. Desta forma, estão mais suscetíveis a infeção intestinal por ETEC característica de DPD, com adesão bacteriana e produção de toxinas ST e LT, envolvidas na patogénese desta doença. Estas toxinas promovem a secreção e diminuição da absorção de eletrólitos e água a nível intestinal, induzindo diarreia e desidratação. Através do conhecimento da etiologia e da patologia da DPD, torna-se possível diagnosticar esta doença a nível molecular, com deteção dos genes que codificam adesinas e enterotoxinas ou destas mesmas moléculas. Para além do diagnóstico, desenvolvem-se medidas de prevenção e de tratamento, que afetem a colonização bacteriana. Estas medidas incluem a vacinação, a melhoria das condições zootécnicas às quais os animais estão sujeitos e a seleção de animais que não produzam recetores para as adesinas e enterotoxinas de ETEC. É importante, ainda, promover a melhoria morfológica, funcional e do microbioma intestinal dos leitões, reduzir a inflamação

e estimular o sistema imune do leitão. Assim, é possível minimizar o desenvolvimento de DPD nos leitões.

A substituição da utilização de AGP por outras formas de tratamento, evitando o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, desencadeou uma investigação intensiva por compostos para o tratamento de DPD. Estes incluem os prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais, enzimas exógenas, minerais de argila, bacteriófagos, anticorpos específicos, péptidos antimicrobianos e nucleóticos. A combinação das estratégias destes compostos bioativos promove a criação de um produto com potencial para tratar a DPD. Por exemplo, a combinação de um conjunto de ácidos orgânicos com diferentes valores de pKa, óleos essenciais, que degradam a membrana bacteriana potenciando o efeito dos primeiros, prebióticos, probióticos e enzimas exógenas. A esta pode-se ainda adicionar uma solução de reidratação oral com glucose e eletrólitos para tratar a desidratação severa nos leitões. Atualmente no mercado existem diversas formulações com alguns destes aditivos, como soluções de reidratação oral com ácidos orgânicos e cloreto de zinco (Agrocid Super Oligo) ou com ácidos orgânicos e óleos essenciais, como o extrato de orégão, com timol e carvacrol (Acidal NC), e da canela, com cinamaldeído (ProPhorce, Biotronic). Adicionalmente, existem formulações contendo imunoglobulinas (Nutrilac Plus). Ao analisar os compostos bioativos interessantes a introduzir numa formulação, garantir a estabilidade deste produto e obter resultados promissores em estudos in vivo é possível a sua comercialização. Mas antes de desenvolver estudos in vivo, é essencial uma avaliação física, química e microbiológica in vitro do produto proposto através de estudos de estabilidade de longa duração ou acelerados, segundo a legislação e as diretrizes nacionais e europeias.

Concluindo, a DPD é uma doença multifatorial caracterizada por distúrbios intestinais derivados de infeção por ETEC. A minimização destes distúrbios é promovida por vários compostos bioativos, incluindo prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais. O desenvolvimento de um produto baseado numa solução de reidratação oral, com glucose e sais, com uma mistura de ácidos orgânicos de cadeia curta e com outros compostos ativos antimicrobianos, promoverá o tratamento desta doença, sem recorrer a antibióticos e representar perigo para a saúde pública. A comercialização deste produto e a sua aplicação na medicina veterinária carece da avaliação da sua estabilidade, garantindo a preservação do seu potencial terapêutico ao longo do armazenamento do produto. Assim,

torna-se possível a criação de uma formulação estável em termos físico-químicos e microbiológicos e passível de aplicação terapêutica veterinária nos leitões, reduzindo as perdas económicas elevadas para a indústria dos suínos.

Capítulo II- Estudo dos componentes e das características ótimas para a criação de um produto com potencial no controlo da DPD em leitões

Os leitões, na fase pós-desmame, apresentam um trato gastrointestinal imaturo e estão sujeitos a stress nutricional, social e ambiental, promovendo alterações funcionais e estruturais a nível gastrointestinal, associadas a baixas ingestões de sólidos e líquidos e elevada mortalidade. O produto líquido a desenvolver, para comercialização pela D.I.N., S.A., que promova a saúde intestinal dos leitões nesta fase do desenvolvimento, insere-se num segmento de mercado não explorado pela maioria das empresas em Portugal. Todavia, existem no mercado rações desenvolvidas para a exploração de suínos com, por exemplo, vitaminas, minerais e/ou ácidos orgânicos em pó. Para além da D.I.N., a SOJAGADO, a Agrolex, a Finançor Agro-Alimentar, a NutriCampo e a Matosmix, entre outras empresas em Portugal, apostam neste segmento de mercado das rações sólidas para suínos com aditivos. No entanto, não existe nenhuma aposta em produtos líquidos para esta fase de transição dos suínos, onde se espera que a ingestão de líquidos seja superior à de sólidos. Geralmente, as empresas desenvolvem estas rações específicas e sugerem a sua administração na forma de papa juntamente com água, facilitando a sua ingestão pelos leitões. Assim, o desafio seria explorar este novo segmento de mercado dos produtos líquidos para animais, pela D.I.N., S.A, em Portugal e para exportação.

A criação de um produto que solucione as elevadas perdas económicas para a indústria de suínos, passa pelo desenvolvimento de um produto completo, atuando nas várias vertentes do problema. Para que isto ocorra, é crucial contrariar a fome, devido à baixa ingestão de ração sólida, tratar a desidratação, incrementar as ingestões de líquidos e promover um efeito antibacteriano intestinal. Dever-se-á, ainda, desenvolver um produto atrativo, em termos de sabor e características organolépticas, promovendo a aceitabilidade deste pelos leitões. Assim, pretende-se criar uma formulação doce, apetecível, com fonte de energia rápida para o animal, como o açúcar simples, com compostos bioativos, com propriedades antibacterianas, com sais e com água como excipiente, promovendo a melhoria do estado de saúde geral do animal.

Neste trabalho, este produto foi criado através da procura de um conjunto de compostos químicos que permitissem a criação de um produto completo, promovendo a sua

apetecibilidade, estabilidade e efeito in vivo, no controlo da DPD, nos leitões. Nesse sentido, foi desenvolvida uma ideia de incorporação de glucose e sais, como solução de reidratação oral e fonte de energia rápida ao animal, e de um adoçante, como forma de melhoria da aceitabilidade do produto. Incorporou-se, ainda, um prebiótico, uma mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos e extratos naturais com propriedades antimicrobianas, com capacidade de atuar no trato gastrointestinal dos animais, induzindo melhorias estruturais e funcionais neste e combatendo o desenvolvimento microbiano intestinal indesejável, principalmente de *E. coli* patogénica. A escolha dos seus constituintes e das suas quantidades dependeu de uma análise de produtos já existentes no mercado e de matérias-primas já existentes na D.I.N., S.A, utilizadas na produção de rações sólidas, tornando o produto o mais económico possível. Relativamente aos sais, foram utilizados sais de NaCl e KCl, garantindo a reposição de iões Na⁺ e Cl⁻, perdidos na diarreia, e a indução de retenção de água. Para além disso, existem no mercado diversas soluções de reidratação oral, com estes sais e glucose, como os Enerlyte Plus[®], Tonisity[™] Px, BlueLite[®], Hidravet[®], Eletric Arão[®], a gama de produtos Pedialyte[®] e o Glucosal[®] (**Anexo 1**). Estes produtos apresentam concentrações de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ entre as 0,5-2 g/L e de glucose entre as 15-50 g/L, sendo o mais comum de 25 g/L. A incorporação da glucose em solução promove a reidratação do animal, potenciando a absorção intestinal de Na⁺, e atua como fonte energética para os animais. Nesta fase do desenvolvimento animal, até mesmo as bebidas energéticas procuradas pelos atletas, como a Gatorade[®], e a Coca-Cola são administradas aos leitões, permitindo contrariar a fraqueza e a morte causadas por baixa ingestão alimentar e induzindo melhoria do trato gastrointestinal animal. Estas bebidas energéticas incluem elevadas quantidades de açúcar, cerca de 50 g/L, e sais NaCl e KCl em solução, entre 0,1 e 0,5 g/L, quantidades ligeiramente inferiores às necessárias para reposição de iões aquando de diarreia constante. Assim, ao adicionar ao produto a glucose e estes sais como fonte de Na⁺ e Cl⁻, em quantidades semelhantes às existentes nos produtos de reidratação oral disponíveis no mercado, espera-se uma promoção da reidratação oral dos animais e uma fonte de energia rápida para estes.

A palatabilidade de produtos alimentares é comumente potenciada com a adição de sacarina de sódio em solução, tal como verificado para o produto Doce&Doce. No entanto, também existem produtos contendo glutamato monosódico na sua constituição, como o Tonisity[™] Px e BlueLite[®] 2B. Relativamente ao produto desenvolvido neste trabalho, a sua

palatabilidade foi promovida pela adição de uma matéria-prima já utilizada na D.I.N., para produção de produtos sólidos para animais, contendo sacarina de sódio. Para além desta, adicionou-se também uma matéria-prima, também existente na D.I.N., baseada em XOS, como prebiótico e palatabilizante, uma vez que este também contribui para a doçura do produto. A adição de prebióticos em produtos disponíveis comercialmente também foi verificada, incluindo alguns da gama Pedialyte[®], contendo Galactooligosacarídeos. Neste produto, as quantidades às quais estes dois compostos foram adicionados à mistura foram ajustadas, evitando uma elevada doçura do produto, já potenciada pela glucose em solução, que pudesse diminuir a sua aceitabilidade pelos animais. Assim, ao adicionar estes dois componentes ao produto em quantidades adequadas, espera-se promover a sua aceitabilidade pelos animais e potenciar a saúde intestinal do animal.

O controlo antimicrobiano intestinal nos leitões com este produto, poderá ser potenciado pela incorporação de uma mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos e de compostos de extratos naturais, com propriedades antimicrobianas. Na literatura e no mercado, existem diversas referências a misturas ácidas contendo ácidos orgânicos de cadeia curta (C1-C7), incluindo o ácido fórmico (CH₂O₂), acético (C₂H₄O₂) e propiónico (C₃H₆O₂), como também alguns destes com características específicas. Estes incluem os ácidos butírico (C₄H₈O₂), como a principal fonte de energia das células a nível intestinal no leitão, e o láctico (C₃H₆O₃), promovendo a transição do leite para a ração sólida pelos animais, frequentemente associado a imunoglobulinas em solução. Os produtos ácidos comercialmente disponíveis incluem os Biotronic[®] Top3, Biotronic[®] SE, ProHacid Classic, Acidmix, BiopH (Hard Water), Easy Acid[™], Acid-Pak[™] 4-way liquid, ProPhorce[™] PH, Daaquasafe, Agrocid Super[™] Oligo e Ultracid[®] P4. Todos estes produtos contêm os ácidos fórmico, acético, propiónico, láctico e/ou cítrico. Para além destes, existem ainda alguns produtos com estes ácidos e também os ácidos sórbico e/ou benzoico, como os ProHacid Advance, DaaCare, DaaLF e Daasal. Existem, ainda, produtos ácidos, com ácido fumárico, málico e/ou ortofosfórico, como o Tetracid 500 e o AcidalML. Relativamente a ácidos orgânicos com características específicas, o Nutrilac Plus é um exemplo de produto que apresenta na sua composição ácido fórmico, juntamente com ácido láctico e imunoglobulinas, favorecendo a transição do leite para a ração sólida pelos animais. Para além deste, existem ainda produtos ácidos contendo o ácido butírico, como é o caso do Adimix, com 30 % de butirato de sódio. Em todos estes produtos presentes no mercado, os diferentes ácidos estão em percentagens

elevadas, para diluição elevada antes da administração. Por exemplo, o BiopH apresenta 50-60 % de ácido fórmico, 1-4 % de ácido acético e 0,5-1,5 % de ácido propiônico, e o Easy Acid contém ácidos acético (10-25 %) e fórmico (25-50 %). O ProPhorce PH 502 apresenta ácidos fórmico (20-30 %), láctico (15-25 %) e propiônico (2-7 %)), o Tetracid 500 é constituído por ácidos cítrico (10%), fumárico (20 %), málico (10 %) e ortofosfórico (10 %) e o Agrocid Super Oligo contém ácidos cítrico (1-5 %), fórmico (35-50 %), propiônico (15-30 %) e láctico (5-15%). A administração de todas estas misturas ácidas baseia-se numa diluição de 1-4/1000 em água, ou mais elevada ainda, promovendo um pH final entre 3.7-4.5, de forma a não administrar um produto demasiado ácido, que seja indesejável, em termos sensoriais e de segurança, para o animal. Desta forma, a mistura ácida desenvolvida e incorporada neste produto consiste num conjunto de ácidos orgânicos de cadeia curta, frequentemente presentes nestes produtos já comercializados, impedindo o desenvolvimento bacteriano indesejável, e ainda um ácido inorgânico, com propriedades bactericidas, mas também fungicidas. Entre estes, inclui-se o ácido butírico e o ácido láctico, com efeitos benéficos específicos na promoção da saúde animal, para além dos seus efeitos como ácidos orgânicos. Desta forma, garante-se um controlo do desenvolvimento de uma maior gama de microrganismos, tanto em termos de estabilidade microbiológica do produto, como também a nível intestinal nos animais, após a sua ingestão. Este produto, contrariamente aos disponíveis no mercado, foi produzido com diluição direta da mistura ácida, tornando-se um produto de administração direta, mais prático, e impedindo-se a diluição indesejável dos restantes compostos ativos, que o compõem. Assim, estes compostos foram também adicionados em quantidades desejáveis para administração direta aos leitões, tendo em conta as ingestões baixas de líquidos nesta fase, de cerca de 0,5 L por dia, por leitão.³ Após a administração desta mistura ácida pelos leitões, espera-se um potencial de controlo microbiano intestinal, tanto bactericida, contra principalmente a *E. coli* envolvida no desenvolvimento de DPD, como também fungicida.

A promoção do controlo microbiano intestinal nos leitões também pode ser potenciada pela presença de compostos bioativos, com propriedades antimicrobianas, presentes em óleos naturais. Estes poderão ajudar na obtenção de um efeito antibacteriano significativo a nível intestinal nos leitões e na estabilidade microbiológica do produto, já promovidos pela mistura ácida, anteriormente referida. Os compostos mais comuns na literatura incluem o timol, presente no óleo de tomilho, e o carvacrol, presente no óleo de

orégão. Os produtos comercialmente disponíveis apresentam timol e/ou cinamaldeído, como o Enviva® EO Swine, o Biotronic® Top3 e o ProPhorce™ PH 502, e carvacrol, como o Acidal ML. Para além destes compostos, existem produtos contendo ácidos gordos, com propriedades antimicrobianas. Um bom exemplo disto é a empresa holandesa Daavision, envolvida na produção de uma gama de produtos para suínos, contendo ácidos gordos de cadeia curta, na sua constituição. Entre estes, o produto DaaCare contém os ácidos caprílico, cáprico e láurico, enquanto que a gama Daafit, Daafit Plus e Daafit Aqua é composta apenas pelo ácido láurico. O Daafit Aqua, para além de promover uma atividade antimicrobiana, derivada do ácido láurico, também apresenta na sua constituição o ácido butírico, potenciando esta atividade, como ácido orgânico. Relativamente a este produto a desenvolver, acrescentou-se na sua composição o cinamaldeído e o ácido láurico. A escolha destes compostos orgânicos deveu-se aos seus elevados potenciais antimicrobianos e, no caso do ácido láurico, a sua existência já numa matéria-prima, presente na D.I.N. e utilizada no fabrico de rações sólidas para animais, comercializadas por esta. O Monomox, esta matéria-prima sólida, contendo ácido láurico na sua composição, foi sujeito inicialmente a testes de solubilidade em água, o excipiente do produto. Este estudo de solubilidade foi realizado na ausência de emulsificantes e na presença de dois tipos diferentes de emulsificantes, já existentes na empresa. Um dos emulsificantes, denominado de E1, consiste numa mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol. O segundo emulsificante, Tween 20 (E432), é um monolaurato de sorbitano de polioxietileno. Esta emulsificação foi promovida com um banho de ultrassons, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a verificação de ausência de solubilidade do Monomox em água, mesmo com estes emulsificantes, por observação de deposição instantânea de partículas, testou-se a sua solubilidade na presença de compostos mais apolares, como o etanol. Após verificação continuada da ausência de solubilidade do Monomox em água, com precipitação imediata de partículas de maiores dimensões em solução, avaliou-se a possibilidade de utilização do próprio emulsificante E432 como fonte deste composto. No entanto, esta possibilidade foi descartada devido às quantidades necessárias serem superiores ao permitido em alimentos. De seguida, pensou-se na utilização do óleo de coco como fonte de ácido láurico, que apresenta cerca de 50 % deste na sua composição. A sua emulsificação em água foi testada na presença de diferentes concentrações dos dois tipos de emulsificantes, mencionados anteriormente, e na presença de etanol, composto mais apolares que potencie esta emulsão

em água. A dispersão das gotículas lipídicas do óleo de coco em água foi avaliada através da observação da aparência visual da solução e do cálculo da turbidez desta, a partir da sua absorvância, medida a 502 nm, comprimento de onda ao qual nenhum composto do óleo de coco absorve, tal como realizado num outro estudo.¹⁴⁷ Desta forma, determinou-se a razão de emulsificantes/água/óleo de coco propícia à sua emulsão em água. A emulsificação escolhida foi aquela que promoveu uma menor turbidez a 502 nm, considerando uma maior concentração de compostos em suspensão. Relativamente ao cinamaldeído, apesar deste apresentar um potencial antimicrobiano elevado e ser solúvel em água, até às 10 g/L a 27 °C, o seu cheiro intenso e característico da canela poderá dificultar a aceitabilidade do produto pelos animais. Para além disso, como o preço desta matéria-prima é mais elevado, estando subjacente um processo de extração desta a partir da canela, foram desenvolvidas mais do que uma formulação do produto, na presença ou na ausência deste composto, a pedido da empresa. Assim, foram desenvolvidas três formulações líquidas diferentes, uma com cinamaldeído apenas, outra com a emulsão de óleo de coco apenas e uma última com ambos, para além dos restantes constituintes anteriormente mencionados. Após a administração destas três formulações pelos leitões espera-se um potencial antimicrobiano destes compostos no controlo da DPD.

A comercialização de um produto só é possível após a realização de vários estudos físico-químicos e microbiológicos, garantindo a sua estabilidade. Mas, para que seja possível a criação de um produto comercializável, é importante a incorporação neste de compostos que promovam a sua estabilidade físico-química e microbiológica, para além dos compostos associados ao seu princípio ativo. A escolha de estabilizantes foi baseada nos aditivos comumente adicionados nos produtos já existentes no mercado, contendo alguns dos princípios ativos deste produto, e também tendo em conta os constituintes específicos deste produto. Através da análise da composição dos vários produtos existentes no mercado, mencionados anteriormente, verificou-se a constante incorporação do ácido cítrico ou dos seus sais, citrato de sódio ou potássio, como conservantes e estabilizantes dos produtos. Para além dos emulsificantes, utilizados na emulsificação do óleo de coco em água, sugeriu-se a incorporação de citrato de sódio neste produto, promovendo a sua conservação e manutenção do pH constante ao longo do tempo, e o EDTA disódico, envolvido na estabilização dos iões K^+ , Na^+ e Cl^- em solução. Adicionalmente, ambos estes compostos são uma fonte extra de iões Na^+ , importantes no tratamento da diarreia. Em termos microbiológicos, não foi

necessária a adição de mais nenhum aditivo, uma vez que estas formulações apresentam um pH ácido de 4,5, devido à incorporação da mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos. Apesar de apresentarem elevada quantidade de glucose e se tratar de produtos líquidos, com elevada atividade de água, nestas condições de pH é muito improvável o desenvolvimento bacteriano. No entanto, alguns fungos, resistentes a condições extremas de pH, poderão se desenvolver.¹⁴⁸ Este desenvolvimento será, provavelmente, controlado pela adição do ácido inorgânico fungicida, presente na mistura ácida, mas caso não o seja, poderá ser evitado com indicações de temperatura de armazenamento, após a realização de estudos de estabilidade a diferentes temperaturas, ou esterilização do produto após embalagem. Assim, com a adição de emulsificantes e destes estabilizantes, espera-se uma promoção da estabilidade das formulações, a longo prazo.

No desenvolvimento de um produto, é necessário ter em conta as suas características físico-químicas e, conseqüentemente, a sua estabilidade microbiológica, na sugestão de indicações de administração e condições de armazenamento e transporte. Uma vez que os leitões começam a reagir, em termos imunitários, e apresentam melhorias estruturais e funcionais do seu trato gastrointestinal, 5 a 7 dias após o desmame³, foi sugerida uma administração deste produto até essa data. Para além disso, o produto foi desenvolvido para uma administração de 0,5 L, por leitão e por dia, tendo em conta as baixas ingestões de líquidos nesta fase³, e segundo condições de administração à temperatura ambiente e após agitação. Desta forma, é possível evitar a solidificação do óleo de coco à superfície da solução, a temperaturas inferiores à sua temperatura de fusão, de 25 °C, e a deposição de sais em solução, aquando da administração das formulações aos animais.¹⁴⁹ Assim, após uma ingestão destas quantidades de produto pelo animal, durante 5 a 7 dias após o desmame, e nas condições indicadas, espera-se uma melhoria da sua condição de saúde geral dos leitões, com controlo da DPD.

Por fim, no desenvolvimento do produto, após o desenvolvimento da ideia e da sua formulação, foi necessário criar uma identidade ao produto, sugerindo um nome adequado e desenvolvendo um rótulo e uma ficha técnica, tendo em conta as indicações de administração e armazenamento. Estas condições, descritas anteriormente, são baseadas na composição do produto e nos resultados dos estudos de estabilidade, necessários para que este seja passível de comercialização. Inicialmente, surgiram várias propostas de nome, como Swine Acid Health, Swine Sweet Health e Swine Sweet Plus, dos quais foi escolhido o Swine Sweet

Health. Este nome é alusivo ao tipo de produto, promovendo a saúde dos suínos, como produto farmacêutico, mas ao mesmo tempo funcionando como uma fonte de energia rápida ao animal. Por outro lado, foram desenvolvidos um rótulo e uma ficha técnica deste produto, segundo o padrão de cores e o modelo de ficha técnica dos produtos da D.I.N., S.A. Estes podem ser consultados nos **anexos 2 e 3** deste trabalho. Assim, atribuiu-se uma identidade ao produto desenvolvido e criou-se um rótulo e uma ficha técnica deste, segundo o conhecimento das suas características.

Em conclusão, do trabalho preliminar e da pesquisa bibliográfica desenvolvidos, decidiu-se testar as três formulações líquidas diferentes, uma com cinamaldeído apenas, outra com óleo de coco apenas e uma última com ambos, para além dos restantes constituintes discutidos anteriormente. Pretende-se, assim, propor o desenvolvimento de um produto completo, único e provavelmente estável, baseado nos princípios ativos individuais de vários produtos já existentes no mercado. Este apresenta glucose, sais, prebiótico, adoçante, compostos de óleos naturais e uma mistura de ácidos orgânicos e inorgânico, com um pH final de 4,5. Este produto deverá ser administrado sem diluição, à temperatura ambiente e após agitação, em quantidades de 0,5 L por leitão por dia. No passo seguinte deste processo será avaliada a estabilidade e aceitabilidade para ambas as formulações do produto, de forma a concluir qual a melhor formulação em termos de potencial químico, mas também em termos económicos. Após a escolha da formulação e a confirmação da sua estabilidade físico-química e microbiológica de, pelo menos, 6 meses, segundo a legislação europeia, e do seu potencial *in vivo*, espera-se um forte impacto no mercado após a sua comercialização. Assim, será possível solucionar um problema muito comum na atualidade, minimizando a utilização de antibióticos, cada vez mais pressionada pelas entidades reguladoras, e as perdas económicas elevadas para a indústria dos suínos.

Capítulo III- Materiais e Métodos

Na realização deste projeto existiu uma preocupação na divulgação de determinados conteúdos, subjacente a questões de confidencialidade impostas pela D.I.N, S.A. Estes conteúdos incluem a composição das formulações criadas, em termos qualitativos e quantitativos, e a sua forma de preparação e dissolução em água no misturador de líquidos. Tendo isto em conta, esta informação referente ao produto, nomeadamente o método detalhado da sua preparação e os seus constituintes, foi omitida desta dissertação. Estes constituintes das misturas preparadas foram mencionados de uma forma genérica.

As formulações do produto Swine Sweet Health, composto por um conjunto de compostos ativos, incluindo compostos antimicrobianos, açúcar e sais, foi produzido segundo condições propostas para a sua produção, na D.I.N. S.A, em elevadas quantidades. Para além disso, foi avaliada a sua aceitabilidade *in vivo*, nas explorações da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em parceria com esta instituição através do Professor Doutor Divanildo, pertencente ao corpo docente do mestrado de Engenharia Zootécnica. Foram, ainda, realizados estudos de estabilidade das três formulações no laboratório da D.I.N., S.A, avaliando as possíveis alterações nas quantidades dos constituintes deste produto e outras propriedades químicas, incluindo o pH e o índice de peróxidos, ao longo de um mês. Por último, procedeu-se igualmente à análise microbiológica destas formulações, ao longo de um mês de estudo. Assim, foi possível realizar uma avaliação preliminar da aceitabilidade e da estabilidade das três formulações diferentes, discutindo qual a mais adequada, tanto em termos de potencial químico, como também em termos económicos.

1. Materiais

Na produção destas três formulações e na avaliação da sua estabilidade, todos os materiais, reagentes e equipamentos foram disponibilizados pelo laboratório da D.I.N., S.A. Por outro lado, nos estudos *in vivo*, os leitões foram obtidos à suinicultura Reis&Silva, em Vila Nova de Famalicão. A descrição das marcas, tanto dos materiais e equipamentos, como dos reagentes, será realizada ao longo da descrição dos diversos métodos efetuados.

2. Produção das três formulações do produto

A produção das três formulações do produto foi realizada em condições idênticas às necessárias para produção do produto líquido em grandes quantidades na D.I.N., S.A. Para isto, recorreu-se a um equipamento, o misturador de líquidos, da Richard Stihler GmbH, em Lahr, Alemanha, com o número de fabricante 7947/1G. Este apresenta uma turbina interna, que promove a mistura eficiente dos componentes, e um termostato, com capacidade de aumento da temperatura, promovendo uma maior dissolução dos componentes da mistura em água. Inicialmente, o equipamento foi descontaminado com uma solução de álcool a 70 %, solução utilizada para desinfecção microbiológica. Posteriormente, foi lavado várias vezes com água destilada e, só de seguida, foram produzidas as três formulações líquidas dos produtos, com lavagem do equipamento com água destilada entre formulações. No laboratório da D.I.N., os componentes sólidos da mistura foram pesados numa balança analítica, enquanto que os constituintes líquidos, foram medidos através de pipetas graduadas. As formulações contendo ácido láurico foram preparadas com a prévia emulsificação do óleo de coco em água, com fusão deste em banho, da Precistern, a 30 °C, e emulsificação em banho de ultrassons, da VWR. Inicialmente, esta emulsificação do óleo de coco em água foi testada na presença de diferentes concentrações de dois emulsificantes, o Tween 20 (E432) e uma mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol (E1) e, ainda, de etanol. Através da observação da aparência visual da solução e do cálculo da turbidez desta, a partir da sua absorvância, a 502 nm, pela **expressão 1**, foi possível determinar qual a condição que favorecia melhor a dispersão das gotículas de gordura do óleo de coco em água.^{147,150} Posteriormente, a emulsão de óleo de coco, com maior dispersão da gordura em solução, foi diluída com os restantes componentes do produto em água, no misturador de líquidos, a 60 °C. Na produção das formulações, a água destilada, obtida a partir do destilador, da Elga, foi adicionada em quantidades conhecidas. Após a dissolução dos compostos, não detalhada por questões de confidencialidade, as formulações foram distribuídas diretamente para as embalagens de 1L, propostas para a sua comercialização. Estas embalagens, da Moldra, seguem os requisitos necessários para a comercialização de produtos líquidos sensíveis à luz, como garantia de impermeabilidade, opacidade e composição em material de acordo com a legislação para armazenamento de produtos alimentares. Assim, desenvolveram-se três formulações líquidas diferentes em água, com o objetivo de contrariar a mortalidade dos leitões nesta fase do desenvolvimento.

$$\text{Turbidez (I)} = \text{Abs}_{502nm} * 2.303 \quad (1)$$

3. Estudo de aceitabilidade

Antes da realização dos estudos de estabilidade, foram realizados estudos de aceitabilidade das três formulações do produto em leitões, após o desmame, nas explorações da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). Os animais foram obtidos à suinicultura Reis&Silva, Lda., em Vila Nova de Famalicão, a partir de porcas com um número de barrigas entre uma e duas. Este estudo de aceitabilidade foi realizado num grupo de 48 leitões, 24 fêmeas e 24 machos, após o desmame, com baixa incidência inicial de diarreia e com idades compreendidas entre os 23 e 31 dias. Estes leitões foram agrupados em parques, 2 a 2, sexo feminino e masculino, com a menor variação de peso possível entre eles. Para além disso, os 48 leitões foram separados em quatro grupos, de 12 animais cada, de forma aleatória, com o fornecimento das três formulações do produto, com ácido láurico apenas, com cinamaldeído apenas ou a formulação com ambos, e um quarto grupo, de controlo, com fornecimento apenas de água nas mesmas quantidades que as formulações. A avaliação da aceitabilidade foi monitorizada através da contabilização das ingestões, tanto de líquidos como de sólidos, por parque e da variação do peso de cada um dos animais. Após o fornecimento dos 0,5 L de produto líquido por leitão por dia, durante 3 dias, avaliou-se a ingestão de líquidos e de sólidos diária e o peso dos animais nos dias 0, 3, 7 e 14 de estudo. As ingestões de líquidos foram contabilizadas através do peso diário dos baldes, onde foram colocados os diferentes tratamentos líquidos. Por outro lado, as ingestões diárias de ração sólida, STARTER LEITÕES G (A31 0310), da D.I.N., foram determinadas através do peso da ração, presente nos comedouros, após 24 h, 48 h e 72 h de administração desta. O STARTER LEITÕES G, é um alimento completo granulado para leitões, composto por aditivos como vitaminas A, D3 e E, enzimas Phytase e Xilanase, metionina e iões importantes para a nutrição animal, como o manganês e o ferro. Todos estes pesos dos líquidos e dos sólidos e os pesos dos animais foram determinados utilizando a mesma balança analítica. Assim, através da comparação destes parâmetros zootécnicos nos diferentes tratamentos com as formulações em estudo e o controlo, é possível avaliar o comportamento animal perante os diferentes produtos e, caso exista, qual a preferência do animal pelas diferentes formulações, em termos sensoriais.

4. Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram realizados no laboratório da D.I.N., S.A, avaliando as propriedades físico-químicas e microbiológicas das formulações ao longo do tempo, segundo condições normais de armazenamento dos produtos, mas também em condições adversas. Os estudos de estabilidade incluíram estudos de estabilidade a diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 41.5 °C) e estudos acelerados, com indução de hidrólise ácida e básica e oxidação das três formulações, ao longo do tempo. Apesar da solidificação do óleo de coco a temperaturas inferiores a 25 °C, também foram realizados os estudos de estabilidade a 5 °C. Como se tratam de produtos com elevada atividade de água e elevada quantidade de glucose, caso exista desenvolvimento microbiano à temperatura ambiente e não a 5 °C, poder-se-á sugerir a sua conservação a 5 °C. No entanto, será importante incluir indicações de utilização, com manutenção do produto à temperatura ambiente, aquando da sua administração, facilitada pelas temperaturas ótimas de 25-27 °C nas produções destes animais, nesta fase do seu desenvolvimento³. Desta forma, será garantida a presença do óleo de côco no estado líquido, miscível em água.¹⁴⁹ Assim, foi possível avaliar a influência da temperatura e da hidrólise ácida e básica e da oxidação das formulações na estabilidade destas, ao longo do tempo.

Os estudos acelerados foram realizados através da monitorização de parâmetros físico-químicos das formulações originais, a partir das quais se prepararam as soluções de stress, e das formulações com indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M) e a oxidação (3 % de H₂O₂), ao fim de 1 e 4 dias de estudo. Estas condições foram escolhidas uma vez que caracterizam a maioria dos estudos acelerados de vários produtos. Estas soluções dos estudos acelerados, foram preparadas através da adição de 150 mL de cada uma das formulações para um balão de 200 mL, perfazendo-se este volume com uma solução de NaOH (0,1 M), da VWR, ou HCl (0,1 M), previamente preparada a partir de HCl (37 %), da VWR. Por outro lado, as soluções com indução de oxidação, foram preparadas a partir da adição de 100 mL das formulações em balões de 200 mL, e posterior adição de 100 mL de solução de H₂O₂ (3 %), a partir de uma solução de H₂O₂ (30 %), da VWR. Assim, foi possível avaliar a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação das diferentes formulações, na sua estabilidade.

Os parâmetros físico-químicos, determinados tanto nos estudos a diferentes temperaturas como nos estudos acelerados, incluem a determinação da aparência da solução, do pH e do índice de peróxidos e a quantificação dos componentes da mistura, incluindo os iões Na^+ , K^+ e Cl^- , a glucose e o ácido láurico. Os iões Na^+ e K^+ foram determinados por absorção atômica. Os iões cloreto foram determinados por titulação. Por outro lado, a glucose foi determinada por HPLC e o ácido láurico foi quantificado por GC-FID. Nestes vários parâmetros medidos para as formulações, os compostos sólidos foram sempre pesados numa balança analítica. A água destilada utilizada, foi obtida a partir do destilador de água, da Elga. Para além dos parâmetros físicos-químicos foram, ainda, determinados parâmetros microbiológicos, mas apenas para os estudos a diferentes temperaturas. Esta avaliação microbiológica das três formulações produzidas, inclui a pesquisa de *Salmonella* e a contagem de *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, microrganismos totais, *Estafilococcus* e bolores e leveduras. A forma como estes parâmetros físico-químicos e microbiológicos variam em função de diferentes condições de armazenamento, poderá elucidar alterações químicas, físicas e microbiológicas que as formulações desenvolvidas possam sofrer. Assim, será possível perceber quais as condições indicadas para garantir a estabilidade destas formulações, a longo prazo, durante o seu transporte e armazenamento.

A determinação do pH destas três formulações foi realizada ao longo do tempo, recorrendo ao medidor de pH SB70P SympHony, da VWR. Inicialmente, calibrou-se o equipamento com soluções tampão a pH 4 e pH 7, armazenadas a 20 °C. Seguidamente, procedeu-se à medição do pH das amostras em duplicado, quando estas já se encontravam há algum tempo à temperatura ambiente. Desta forma, tentou-se evitar a influência da temperatura na medição do pH.

A avaliação da aparência da solução foi determinada por espectrofotometria de UV/visível entre os 380 e 720 nm.¹⁵¹ Primeiro, definiu-se no espectrofotómetro UV- 3100PC de radiação UV/visível, da VWR, a gama de valores de comprimento de onda na zona da radiação visível (380-720 nm). De seguida, obteve-se o espectro da absorvância em função do comprimento de onda do branco, lendo a cuvete, da VWR, contendo o branco, correspondente à água destilada. Da mesma forma, obtiveram-se, seguidamente, os espectros das três formulações finais. Assim, é possível avaliar a cor da solução destas formulações e possíveis alterações na sua aparência, através de alterações na sua absorvância, para comprimentos de onda na zona do visível.

A determinação do índice de peróxidos é importante para avaliar a possível alteração no grau de oxidação das formulações ao longo do tempo, em diferentes condições.¹⁵² Inicialmente, pesou-se 10 g de amostra para um erlenmeyer de 250 mL. Seguidamente, adicionou-se 40 mL de solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) e homogeneizou-se a solução. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução de iodeto de potássio saturada, preparada a partir deste reagente, da VWR, e homogeneizou-se a solução. Após repousar 10 minutos no escuro, adicionou-se 30 mL de água destilada e 1 mL de cozimento de amido e homogeneizou-se o preparado. Por fim, titulou-se esta solução com uma solução de tiosulfato de sódio 0.01N, previamente preparada a partir de uma solução de tiosulfato de sódio 0.1N, da VWR, recorrendo a um titulador, da marca Schoot Titronic® Universal. Paralelamente à realização deste procedimento para as amostras, realizou-se do mesmo modo para o branco, mas na ausência de amostra. Após medir o volume de titulante utilizado, calculou-se o índice de peróxidos através da **expressão 2**, onde V e V_0 representam o volume, em mL, da solução de tiosulfato de sódio gasta na titulação das amostras e do ensaio em branco, respetivamente. Ainda, N representa a concentração, expressa em normalidade, da solução de tiosulfato de sódio e m faz referência à massa, em gramas, de amostra utilizada nesta análise. O resultado foi apresentado pela média aritmética de dois ensaios paralelos.

$$\frac{(V-V_0) \times N \times 1000}{m} \quad (2)$$

A avaliação da estabilidade de um produto alimentar carece da determinação da concentração dos seus constituintes ao longo do tempo. A quantificação de Na^+ e K^+ foi realizada por absorção atômica.¹⁵³ Inicialmente, pesou-se 10 g de amostra para um copo de vidro e digeriu-se a amostra com 20 mL de solução de HCl (6 M), num banho de areia, da Harry Gestigkeit GmbH, a 40 °C, durante 40 minutos. A solução de HCl (6 M) foi previamente preparada a partir de uma solução de ácido clorídrico (37 %), da VWR. Após arrefecimento, transferiu-se a amostra para um balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se até á marca com água destilada. De seguida, após homogeneizar a solução, filtrou-se esta com papel de filtro qualitativo, de fluxo médio, com 150 mm de diâmetro, da VWR. Em paralelo às amostras das formulações, realizou-se o branco, seguindo o mesmo procedimento, mas na ausência de amostra. Antes das determinações das concentrações dos iões nos filtrados

obtidos, foram preparadas curvas padrão de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2, 5% de Na^+ e K^+ , a partir de soluções de 1000 $\mu\text{g/mL}$ destes íões, da AppliChem Panreac, com a adição sempre de 20% de uma solução de interferência, devido à elevada instabilidade destes íões. Esta solução de interferência foi preparada através da diluição de 2,5 mL de ácido nítrico (68 %), da VWR, para 100 mL de água destilada. De seguida, para determinação dos íões de K^+ e Na^+ , seleccionou-se no equipamento o íão a ser medido e os comprimentos de onda, de 766,5 nm e 589,6 nm, para a determinação de K^+ e Na^+ , respetivamente. Seguidamente, ajustou-se o espectrómetro de absorção atómica, da PerkinElmer, modelo AAnalyst 400, otimizando a resposta deste instrumento, para a medição de uma absorvância de zero, com uma chama de ar-acetileno, na presença do padrão de concentração zero. Após a leitura das soluções padrão e construção da curva-padrão, leram-se as amostras em duplicado. No caso do íão K^+ , foi necessária uma prévia diluição de 1:10 dos filtrados obtidos, enquanto que no caso do Na^+ foi necessária uma diluição de 0,1:10 destes, de forma a que os valores obtidos de concentração dos íões em solução se encontrassem na curva de calibração. Por fim, o resultado obtido foi multiplicado pelo fator de diluição e dividido pela massa da amostra, utilizada na determinação, e o resultado final foi expresso como a média aritmética das duas determinações para cada amostra. Assim, foi possível avaliar a variação das concentrações destes íões e, conseqüentemente, a sua estabilidade em solução.

A determinação do teor de cloretos das formulações foi realizada por titulação com tiocianato de potássio 0,1 N.¹⁵⁴ Para isto, adicionou-se 5 mL de amostra para um balão de 500 mL. De seguida, juntou-se 1g de carvão ativado, 400 mL de água destilada, 5 mL de solução Carrez I e 5 mL de solução Carrez II. A solução Carrez I foi preparada previamente, através da dissolução de 22 g de acetato de zinco, da PanReac AppliChem, e 3 g de ácido acético glacial, da VWR, em água num balão volumétrico de 100 mL, perfazendo-se o volume com água destilada. Por outro lado, a solução Carrez II foi preparada com a dissolução de 10,6 g de ferricianeto de potássio, da Fisher Chemicals, em água destilada num balão volumétrico de 100 mL, perfazendo-se, posteriormente, o volume com água destilada. Após agitação das amostras, no agitador OS-500, da VWR, durante 30 minutos, na opção de velocidade 3.5, perfez-se o volume de 500 mL com água destilada. De seguida, homogeneizou-se e filtrou-se a solução, com papel de filtro qualitativo da VWR, com fluxo médio e retenção de partículas com 5 a 13 μm . Posteriormente, retirou-se 100 mL deste filtrado, para um erlenmeyer de 200 mL. A este volume juntou-se 5 mL de ácido nítrico

(68%), da VWR, 2 mL de solução saturada de sulfato de ferro III e amônio e 2 gotas de solução de tiocianato de potássio 0,1 N, da VWR. A solução de sulfato de ferro III e amônio foi previamente preparada através da dissolução de sulfato de ferro III e amônio, da VWR, em quantidades para a obtenção de uma solução saturada e adição de ácido nítrico (68 %), da VWR, em quantidades suficientes para decorar esta solução (cerca de 5 mL por 100 mL). Após homogeneização da solução do filtrado obtida, adicionou-se 10 mL de nitrato de prata (0,1 M), da VWR. Posteriormente, homogeneizou-se a solução e titulou-se o excesso de nitrato de prata em solução com uma solução de tiocianato de potássio 0.1N, até a coloração vermelha-acastanhada persistir, durante pelo menos 30 segundos. Esta titulação foi realizada utilizando uma bureta, e com agitação constante, com um agitador magnético, da Heidolph, modelo MR 3001. Paralelamente, executou-se todo este processo para o branco, mas na ausência de amostra. O teor de cloretos foi expresso em percentagem de massa de cloreto de sódio e calculado através da **expressão 3**. Nesta expressão, V , V_1 , V'_1 , V_2 e V'_2 são volumes, em mL, utilizados do filtrado da amostra, de solução de nitrato de prata nas amostras e no ensaio do branco e de solução de tiocianato de potássio gasta na titulação da amostra e gasto no ensaio do branco, respetivamente. Para além disso, o m representa a massa, em gramas, da amostra utilizada no método. O resultado foi expresso como a média aritmética de duas determinações. Assim, foi possível averiguar a possível precipitação dos iões cloreto em solução, ao longo do tempo, sob diferentes condições de estudo.

$$\frac{50 \times 5,845 \times [(V_1 - V'_1) - (V_2 - V'_2)]}{V \times m} \quad (3)$$

A quantificação da glucose presente nas três formulações, ao longo do tempo, foi determinada por HPLC.¹⁵⁵ Inicialmente, adicionou-se 5 mL de amostra a um balão volumétrico de 100 mL. De seguida, adicionou-se à amostra 50 mL de álcool, da Aga, a 50%. A solução preparada foi aquecida num banho a 80-85 °C, da Precistern, durante 25 minutos, com constante agitação. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de Carrez I e 1 mL de Carrez II à solução e perpez-se o balão volumétrico com álcool a 50%. As soluções de Carrez I e Carrez II foram preparadas da mesma forma que foi descrita na determinação dos cloretos. Subsequentemente, homogeneizou-se e filtrou-se a solução, através de uma seringa de 10 mL, da Iberject, e um filtro de seringa de nylon 25 mm, de 0,45 µm, da Cronus Filter, para vial de 1.5 mL, da VWR. Por fim, inseriu-se o vial da amostra e

das soluções padrão de 0,25 %, 0,5 % e 1 % de glucose ou de uma solução de 1 % de glucose, frutose e sacarose, todos da Fisher Chemicals, no equipamento de HPLC, LaChrom Elite da VWR, modelo Hitachi. Este equipamento foi programado para uma injeção automática de 10 µl de amostra ou solução padrão na coluna e com um fluxo de fase móvel de 1,5 – 2,5 mL/min. A fase móvel utilizada foi uma solução de 85% de acetonitrilo, da Fisher Chemicals, e 15% de água destilada. Por outro lado, a fase estacionária utilizada foi uma coluna de HPLC de NH₂, de 100-4,6 mm, da Chromolith® Performance, e o detetor foi um refratómetro diferencial, com capacidade de medição do índice de refração da glucose (RI). O ensaio foi realizado em duplicado para cada amostra, apresentando-se o resultado como a média aritmética das duas determinações. Mediu-se a área do pico da glucose obtido no cromatograma e expressou-se o resultado, em g/L, segundo a **expressão 4**, onde x é a concentração de glucose obtida, comparando as áreas dos picos da amostra com a(s) da(s) solução(ões) padrão, com concentração conhecida. Para além disso, o V representa o volume total de solução preparada (100 mL) e m é a massa de amostra utilizada no ensaio.

$$[\text{glucose}] = \frac{x \cdot V}{m} \text{ (g/L)} \quad (4)$$

A quantificação de ácido láurico, nas diferentes formulações, foi realizada por GC-FID, da Shimadzu, modelo GC-2025.¹⁵⁶ Inicialmente, realizou-se a extração lipídica dos produtos com éter de petróleo, da Fisher Chemicals, e posterior metilação com trifluoreto de boro (BF₃), da Sigma. Nesse sentido, inicialmente, procedeu-se a hidrólise de 5 g de amostra em placa de areia, da Harry Gestigkeit GmbH, a 60 °C, durante 1h, após fervura, com solução de HCl, a 50%. Esta solução de HCl foi previamente preparada, a partir da solução de ácido clorídrico (37%), da VWR. Posteriormente, filtrou-se o hidrolisado com água destilada, adicionando celite 545 ao papel de filtro qualitativo, com fluxo médio e retenção de partículas de 5 a 13 µm, ambos da VWR. Após várias lavagens do papel de filtro com água destilada e secura à temperatura ambiente, este foi dobrado e colocado numa cartucha, da Prat Dumas France, com 33/38x100 mm, com algodão por cima. As cartuchas, contendo os hidrolisados das amostras, foram colocadas, em garras metálicas, dentro de copos de vidro, previamente tarados e pesados, específicos para encaixe no equipamento de extração lípica Soxtherm, da Gerhardt. Posteriormente, procedeu-se à extração lipídica destas amostras neste equipamento, com a adição de 150 mL de éter de petróleo, da Fisher Chemicals. Após a extração e evaporação do éter, adicionou-se 2 ml de acetona, da Valente e Ribeiro Lda., e

colocou-se os copos a 103 °C, durante 15 a 20 minutos. Posteriormente, pesou-se o copo contendo a amostra, tornando-se possível a determinação do teor de gordura, através da diferença de pesos do copo antes e após a extração, dividida pela massa utilizada no ensaio. À gordura extraída, foram adicionados 6 mL de KOH (0.5M), previamente preparado a partir de KOH sólido, da VWR, sob aquecimento durante 5 minutos, e, posterior adição de 7 mL do trifluoreto de boro, da Sigma. Por fim, juntou-se 5 mL de isooctano, da VWR, e 30 mL de solução saturada de cloreto de sódio, favorecendo a separação da gordura esterificada, por fases. A fase superior, de gordura, foi retirada para vial, que foi introduzido posteriormente no equipamento de GC-FID. O método de GC-FID utilizado para a determinação do perfil lipídico das amostras, foi proposto pela Phenomenex, utilizando a coluna ZB-FAME, com 30metrosx0.25mmx0.20µm, e o hélio, como fase móvel, com um fluxo de 1.2 mL por minuto. O GC-2025, da Shimadzu, foi programado para uma corrida de 2 minutos a 100°C, aumento de 10°C por minuto para 140°C, depois subida de 3°C por minuto para 190°C e, por fim, aumento de 30°C por minuto para 260°C, mantendo-se esta temperatura no final durante 2 minutos. Para além disso, o detetor FID foi mantido a 260°C. Assim, foi possível avaliar a variação das concentrações do ácido láurico ao fim de um mês de estudo, de forma a garantir a estabilidade deste composto antimicrobiano nas várias formulações, ao longo do tempo.

Para além da análise físico-química das três formulações finais do produto, avaliou-se a estabilidade microbiológica destes. As análises microbiológicas basearam-se na pesquisa de *Salmonella* e contagem de microrganismos totais, *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, *Estafilococcus*, e bolores e leveduras nos dias 1, 15 e 30 de armazenamento, sujeitos a temperaturas de 5 °C, 25 °C e 41.5 °C. Todos estes procedimentos foram realizados utilizando material estéril e em câmara de fluxo, da marca Steril-Polaris, e as contagens dos microrganismos foram conseguidas com o contador de colónias, da Dario Correia, Lda. Assim, foi possível avaliar o possível desenvolvimento microbiológico nas formulações desenvolvidas durante um mês e em função da temperatura, à qual estas soluções possam estar sujeitas aquando do seu armazenamento e transporte.

A determinação dos vários parâmetros microbianos foi realizada de uma forma muito semelhante, com a inicial produção do meio de cultura, específico para cada parâmetro, inóculo das placas, incubação em estufa e posterior leitura destas. Relativamente à produção dos meios de cultura, para a contagem dos microrganismos totais dissolveu-se 20,5 g de

meio não seletivo PCA (*plate count agar*)¹⁵⁷ desidratado (BK144), da Biokar Diagnostics num litro de água destilada, com aquecimento e agitação. Este meio PCA desidratado apresenta 5,0 g de triptona, 2,5 g de extrato de levedura, 1 g de glucose desidratada (C₆H₁₂O₆) e 12 g de agar, com pH ajustado para 7.0 ± 0.2, a 25 °C. Para a contagem de bactérias do género *Enterobacteriaceae*, pelo método RAPID'Enterobacteriaceae da Bio-Rad¹⁵⁸, dissolveu-se 1,5 g deste meio, da Bio-Rad, na forma desidratada, em 13,5 litros de água destilada. Por outro lado, para a contagem de *Escherichia coli* dissolveu-se 30,6 g do meio de cultura de TBX(*Tryptone-bile-glucuronic medium*)¹⁵⁹, forma desidratada, da Biokar Diagnostics (BK146), em 1 litro de água destilada, com fervura e agitação constante. Este meio TBX desidratado apresenta 20,0 g de triptona, 1,5 g de sais biliares nº3, 75,0 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β- ácido D-glucurónico (BCIG) e 9,0 g de agar. A pesquisa de *Salmonella* nas formulações líquidas foi realizada através do método Rapid'*Salmonella* da Bio-Rad¹⁶⁰, com a dissolução de 1,5g de meio RAPID'*Salmonella* desidratado, da Bio-Rad, em 11,5 L de água destilada, com agitação constante. Ainda, para a contagem de bolores e leveduras dissolveu-se 30,0 g de meio de cultura DRBC (*Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar*)¹⁶¹ desidratado (BK198), da Biokar, num litro de água destilada, com fervura e agitação constante. Este meio é composto por 5,0 g de polipeptona, 100 g de D-glucose, 1,0 g de fosfato de monopotássio, 0,5 g de sulfato de magnésio, 2,0 mg de diclorano, 25,0 mg de “*rose bengal*”, 50,0 mg de cloramfenicol, 50,0 mg de cloridrato de clorotetraciclina, 10,0 mg de sulfato de zinco heptahidratado, 5,0 mg de sulfato de sobre pentahidratado, 1,0 mL de tergitol e 12,4 g de agar, com pH de 5,6±0,2 a 25°C. Por último, a contagem de *Estafilococcus* nas formulações do produto líquido foi realizada recorrendo a um meio de agar de fibrinogénio de plasma de coelho, segundo a norma ISO 6888-2:1999¹⁶², com a prévia dissolução de 54,9 g deste meio na forma desidratada (BK055), da Biokar, em 900 mL de água destilada. Após a preparação de todos estes meios, estes foram distribuídos em frascos de 0,5 L, da Normax, e esterilizados na autoclave Uniclave88 (44x60cm), da A.J. Costa (Irmãos) Lda., a 121 °C, durante 15 minutos. Por fim, foram mantidos a 44-47 °C, antes da sua utilização, num banho de água, Memmert, da Dario Correia, Lda.

Após a preparação dos diversos meios de cultura, inocularam-se placas de petri, da VWR, transferindo 1 mL do produto líquido para a primeira placa de petri com uma pipeta estéril de 1mL, da VWR. De seguida, realizou-se uma diluição de 10⁻¹, a partir da solução inicial, com uma nova pipeta estéril, em água peptonada tamponizada (APT) num tubo de

ensaio. Após homogeneização da solução diluída, utilizando o vortex, Reax top da Heidolph, retirou-se 1 mL desta para uma placa de petri estéril, correspondente à segunda diluição, e 0,1 mL desta para outra placa de petri, correspondente à terceira diluição, para as formulações a 25 °C e 41.5 °C, onde será esperado maior desenvolvimento microbiológico, e apenas a segunda diluição para as formulações a 5 °C. Este procedimento, foi realizado para todos os parâmetros microbiológicos, exceto na pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Estafilococcus* e bolores e leveduras. Para a contagem de *Estafilococcus*, foram realizadas sempre só duas diluições, uma placa com 1 mL da amostra original e uma segunda placa com 1 mL da diluição de 1/10 desta em APT, para ambas as temperaturas estudadas. Relativamente à contagem de bolores e leveduras, primeiro foram adicionados 15 mL do meio DRBC preparado anteriormente em caixas esterilizadas e, após solidificação deste na câmara de fluxo, adicionou-se 0,1 ml de amostra a uma placa de agar DRBC, correspondente à segunda diluição da amostra, e 1 ml de amostra, dividido igualmente, por outras três placas, correspondentes à primeira diluição das formulações. De seguida, espalhou-se o líquido pela superfície da placa de agar, com um espalhador estéril, da VWR, até o líquido estar completamente absorvido no meio. Por último, na pesquisa de *Salmonella* realizou-se uma diluição prévia de 10 vezes de 10 mL de amostra não diluída em água peptonada tamponizada (APT), com uma pipeta de 10 mL estéril, da VWR, e adição de 0,4 mL de um suplemento para o crescimento específico de *Salmonella*, da Bio-Rad, com uma pipeta estéril de 1 mL, da VWR, num saco estéril, da VWR. Posteriormente, homogeneizou-se o saco, utilizando o homogeneizador Stomacher 400, da LaboControle, e incubou-se este durante $18h \pm 2h$, a $41.5^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, na incubadora INCU-Line, da VWR. Após esta prévia incubação, replicou-se 10 µl do inóculo em placa de agar RAPID' *Salmonella* por espalhamento, com espalhadores da VWR. Posteriormente à preparação de todos estes inóculos, foram adicionados entre 12 a 15 ml dos meios respetivos para cada uma das determinações, às placas que ainda não continham meio. Para estas placas, misturou-se cuidadosamente o inóculo com o meio, agitando estas e deixando-as solidificar na câmara de fluxo.

Após solidificação completa do meio nas placas todas, realizou-se a incubação destas a temperaturas correspondentes às temperaturas ótimas de crescimento dos respetivos microrganismos a avaliar. Na pesquisa de *Salmonella* e contagem de bolores e leveduras, as placas foram colocadas na posição direita numa incubadora Memmert, da Dario Correia, Lda., a $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, durante $24h \pm 2h$. Por outro lado, para a contagem de *Enterobacteriaceae*,

as placas foram colocadas, também na posição direita, numa incubadora TS 606/2-i, da WTW, a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 5 dias. Na primeira incubadora mencionada, também se incubaram as placas para contagem de *Estafilococcus*, mas na posição invertida, a 37°C , durante 24h. Por fim, a contagem de microrganismos totais foi realizada após a incubação das placas de petri, para esta contagem, invertidas numa incubadora IN260, da Memmert, a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 72 ± 3 horas, enquanto que a contagem de *E. coli* requiere a incubação das placas inoculadas invertidas, numa incubadora, da Memmert, a 44°C durante 18-24h.

Após os tempos de incubação, foi avaliada a presença de colónias roxas/mangentas, de *Salmonella*, de colónias rosa claras, de leveduras, e colónias filamentosas, dos bolores. No caso dos bolores e leveduras, contagem das colónias é feita através da contagem das colónias totais nas três placas correspondentes à primeira diluição, ou contagem das colónias na placa correspondente à segunda diluição, tendo em conta a respetiva diluição. Para a contagem de *Estafilococcus*, contou-se as colónias pequenas verdes ou pretas, ou por vezes até brancas rodeadas por um halo de precipitação, indicativo da atividade de coagulase. O número de *Estafilococcus* coagulase-positiva presentes por ml foi obtido pela **expressão 5**, onde ΣC é a soma das colónias de todas as placas selecionadas, V é o volume de inóculo em cada placa, em mL, n_1 e n_2 são o número de placas selecionadas na primeira e segunda diluição, respetivamente, e d é a diluição correspondente à primeira diluição selecionada, à suspensão inicial, que neste caso é 1. Por outro lado, os microrganismos totais foram avaliados pela contagem das colónias nas placas, e a sua contagem foi calculada através da **equação 6**, onde C é a soma da contagem de colónias de duas placas obtidas por diluições sucessivas da amostra original, contendo uma delas pelo menos 10 colónias. Para além disso, V representa o volume de inóculo colocado em cada placa, em mL, e d é a diluição correspondente à primeira placa, que neste caso é 1. Assim, foi possível avaliar o desenvolvimento microbiológico nas três formulações, ao longo do tempo, abrangendo várias espécies microbianas. O número de *Enterobacteriaceae* desenvolvidas em solução, foi avaliado, ainda, pela contagem das colónias vermelhas desenvolvidas nas placas. Por fim, foi realizada também a contagem de colónias típicas de *Escherichia coli*, positivas para β -glucuronidase, em cada placa de TBX inoculada, segundo a **equação 7**. Nesta equação, a é a soma de colónias em todas as placas, contendo pelo menos uma delas 15 colónias azuis, n_1 é o número de colónias da primeira placa de petri, sem diluição, e V faz referência ao volume de inóculo, em ml, aplicado em cada placa. O n_2 representa o número de colónias na

primeira diluição e d é o fator de diluição correspondente à primeira placa, que neste caso é 1. Assim, foi possível avaliar se as condições de temperatura estudadas, às quais as formulações possam ser sujeitas, aquando do seu armazenamento, poderão promover o desenvolvimento de microrganismos totais e mais especificamente de *Salmonella*, bolores e leveduras, *Estafilococcus*, espécies do género *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli nas* três formulações desenvolvidas, ao longo do tempo. Os bolores e leveduras, são um dos microrganismos mais importantes a determinar nestas formulações, uma vez que são mais resistentes a valores de pH ácidos.

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1+0,1n_2)d} \quad (5)$$

$$N = \frac{\text{Soma de } C}{V \times 1,1 \times d} \quad (6)$$

$$N = \frac{\text{Soma de } a}{V(n_1+0,1n_2)d} \quad (7)$$

Assim, determinaram-se estes vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, para cada uma das formulações a diferentes temperaturas, e nos dias 1 e 4 de estudo acelerado, quando induzida a hidrólise ácida, com HCl 0,1 M, e básica, com NaOH 0,1 M, e a oxidação, com 3 % de H₂O₂, destas formulações. Este estudo de estabilidade permitirá avaliar se as diferentes condições de temperatura, às quais as formulações possam ser sujeitas, e estas condições de stress, influenciam o pH, o índice de peróxidos e a estabilidade de cada um dos constituintes do produto. As alterações que possam ocorrer no pH das formulações, refletem alterações químicas que interfiram com a concentração de iões H⁺ em solução, enquanto que alterações no seu índice de peróxidos, refletem a influência destas condições estudadas na estabilidade oxidativa do produto. Desta forma, será possível perceber como é que a estabilidade do produto é afetada por estas condições estudadas e sugerir condições de armazenamento deste, propícias à manutenção da sua estabilidade.

5. Avaliação estatística

Os resultados obtidos nos estudos de aceitabilidade e estabilidade das formulações deverão ser analisados, em termos estatísticos. No entanto, isto apenas foi realizado para os estudos de aceitabilidade, uma vez que, nos estudos de estabilidade, apenas foi possível a realização de duplicados das várias determinações de uma só amostra de cada formulação em cada condição, em vez dos ideais triplicados de duas amostras de cada condição, às quais cada produto foi sujeito. Como tal, estes resultados não foram analisados, em termos estatísticos, mas foram discutidos em termos de tendências. O laboratório da D.I.N. apresenta um elevado número de clientes e, conseqüentemente, uma elevada quantidade de amostras, para análise físico-química e microbiológica, no seu sistema diariamente. Desta forma, foi necessário conciliar a realização destes estudos com o trabalho diário de laboratório na D.I.N. Relativamente aos estudos *in vivo*, os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente, utilizando o Sigma Plot 14.0, o SPSS 25 e o Excel 2016, através do teste One Way ANOVA de medidas repetidas, com análise posthoc, através do teste de Tukey, após garantida a normalidade dos dados pelo teste de Saphiro-Wilk. A avaliação estatística das ingestões dos líquidos e dos sólidos e dos pesos dos animais, foi realizada inicialmente considerando o grupo de animais como um todo, e separadamente, em grupos consoante o sexo, a idade dos animais ou idade média por parque, no caso das ingestões, e/ou por peso inicial dos animais ou peso combinado, no caso das ingestões, avaliadas por parque. Por último, foi realizada, ainda, a análise estatística dos casos com diarreia. Desta forma, foi possível avaliar a influência da idade do animal e do sexo na variação de peso, ao longo do tempo, e a influência da idade média por parque e do peso inicial combinado por parque nas ingestões de sólidos e líquidos, verificando se existem discrepâncias nestes parâmetros medidos *in vivo*, para os diferentes tratamentos.

Capítulo IV – Resultados e Discussão

1. Desenvolvimento das formulações

A incorporação de uma fonte de gordura, como o óleo de coco, como fonte do ácido láurico, num solvente polar, carece de uma emulsificação deste em gotículas de gordura, garantindo a sua dispersão em solução. Nesse sentido, o desenvolvimento das formulações contendo ácido láurico envolveu uma avaliação prévia da emulsificação do óleo de coco em água, em concentrações propícias aos efeitos antimicrobianos do ácido láurico, que o compõe. Antes deste estudo com o óleo de coco, testou-se a possibilidade de utilização de uma matéria-prima, denominada Monomox, do grupo CCPA, presente na D.I.N., contendo ácido láurico na sua composição. A tentativa de aproveitamento desta matéria-prima, visou a minimização dos custos associados ao produto. Para isto, foi testada a solubilização desta matéria-prima em água, na ausência e na presença de dois emulsificantes, o Tween 20 (E432) e uma mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol (E1), e, ainda, de etanol, como solvente mais apolar, que pudesse facilitar a sua solubilização. Nestas condições, verificou-se a insolubilidade do Monomox em água, através da observação da deposição imediata de partículas de maiores dimensões em solução. Após a rejeição de utilização do Monomox, como fonte de ácido láurico, devido à sua insolubilidade em água, testou-se o óleo de coco, como fonte deste composto, apresentando 50 % deste ácido gordo na sua constituição. Para além disso, o óleo de coco apresenta uma temperatura de fusão de 25 °C, aproximadamente, podendo-se favorecer a emulsão da sua gordura com emulsificantes, no seu estado líquido à temperatura ambiente, recorrendo a um banho de ultrassons. Assim, foram realizados estudos de emulsificação do óleo de coco em água, na ausência e na presença de diferentes percentagens dos emulsificantes Tween 20 e de uma mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol (E1) e, ainda, de etanol, que favorece a emulsificação do óleo de coco em água. Através da avaliação da turbidez destas emulsões, foi estudada qual a emulsão que melhor favorece a dispersão da gordura do óleo de coco em água, tanto em termos qualitativos como quantitativos.

A turbidez, calculada a partir da absorvância, medida a 502 nm, foi utilizada como medida da dispersão da gordura do óleo de coco em emulsões, na presença de diferentes percentagens dos emulsificantes Tween 20 (E432; T20) e mistura de ricinoleato, glicerol e

propilenoglicol (E1) e/ou de etanol. Os resultados obtidos da absorvância, a 502 nm, e da turbidez destas emulsões estão descritos na **tabela 2**. Através da análise destes resultados, verificou-se uma tendência para menores valores de absorvância, a 502nm, e turbidez e, conseqüentemente, aparência menos turva, na presença do emulsificante de Tween 20, comparativamente à mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol (E1). Os valores de turbidez médios foram de 3.1, 2.5, 3.1, 2.0, 1.9, 1.0 e 2.4, na presença de 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % e 5 % do emulsificante E1, respectivamente, enquanto que os valores de turbidez para o emulsificante Tween 20 foram de 1.4, 0.5, 1.1, 1.1 e 1.3, para as concentrações de 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 % e 1 % deste, respectivamente. A avaliação da influência do etanol na dispersão do óleo de coco em solução, demonstrou uma tendência para maiores valores de turbidez, relativamente aos obtidos para as diferentes concentrações de Tween 20 e E1. Estes valores foram de 4.0, 3.6, 4.7, 3.8, 2.5, 3.9 e 4.6, na presença de 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 1 %, 2,5 % e 5 % de etanol, respectivamente. Tendo em conta estes resultados, foi avaliada também a combinação de baixas percentagens de etanol, como 0.2 % e 0.3 % deste com 0.2 % de Tween 20 e 0,2% de E1. A escolha de 0,2 % de Tween 20 nesta combinação, deveu-se à obtenção de uma emulsão do óleo de coco com menor turbidez e, conseqüentemente, mais transparente e maior dispersão da gordura em solução, uma vez que uma maior turbidez reflete uma maior concentração de solutos em suspensão.¹⁴⁷ Relativamente ao E1, verificou-se uma tendência para valores de turbidez próximos, exceto na presença de 3 % de E1, na qual se verificou uma tendência para um valor de turbidez inferior. Como esta é uma percentagem demasiado elevada deste componente, avaliou-se a combinação de 0.2 % e 0.3 % de etanol com as menores percentagens deste emulsificante, de 0.1 % e 0.2 %. A utilização de elevadas quantidades de emulsificantes são consideradas ineficientes em termos económicos e podem resultar em distúrbios nas propriedades sensoriais das formulações do produto a desenvolver.¹⁴⁷ Os resultados obtidos para a combinação de 0.2 % de etanol com 0.1 % e 0.2 % de E1 foram de 4.0 e 4.1, enquanto que a combinação de 0.3 % de etanol com estas mesmas percentagens de E1 promoveu a formação de emulsões de óleo de coco com valores de turbidez de 3.4 e 4.1. Por outro lado, a combinação de 0.2 % e 0.3 % de etanol com os 0.2 % de Tween 20, demonstraram emulsões com tendência para maior dispersão de gordura em solução, que as das combinações anteriores com E1, uma vez que se verificou uma tendência para valores de turbidez mais baixos, de 2.1 e 2.7, nestas condições. Por último, avaliou-se a estabilidade

das emulsões de óleo de coco após a combinação de 0.2 % ou 0.3 % de etanol com 0.2 % de ambos os emulsificantes, de forma a perceber se a combinação destes pode favorecer a estabilidade da emulsão. Os valores de turbidez obtidos foram de 4.9 e 5.7 para as emulsões contendo 0.2 % de etanol e 0.3 % de etanol, respectivamente, para além dos 0.2 % de ambos os emulsificantes. Tendo em conta estes resultados, verifica-se, novamente, uma tendência para a diminuição da dispersão óleo de coco em solução, associada ao aumento da turbidez, com o aumento da concentração de etanol. Não se verifica, ainda, um efeito superior de dispersão da gordura do óleo de coco em solução, após a combinação de iguais percentagens dos dois emulsificantes estudados. Assim, demonstra-se que a emulsão de óleo de coco em água, nas quantidades requeridas para o efeito antimicrobiano do ácido láurico que o compõe, apresenta uma maior dispersão de gotículas da sua gordura em solução, com menores valores de turbidez, na presença de 0.2 % do emulsificante Tween 20 e da combinação deste, a 0.2 %, com baixas concentrações da mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol e de etanol.

Concluindo, foi possível avaliar a turbidez da emulsão de óleo de coco em água, em concentrações propícias para o efeito antimicrobiano do ácido láurico que o compõe, na presença de diferentes emulsificantes e de etanol. Os resultados obtidos demonstraram uma tendência para o aumento da turbidez após a adição de etanol, comparativamente à presença dos emulsificantes E1 e Tween 20, e do emulsificante E1, comparativamente ao emulsificante Tween 20. Na presença deste último emulsificante, obtiveram-se menores valores de turbidez para concentrações de 0.2 %. Assim, uma vez que um aumento de turbidez reflete um aumento de solutos em suspensão, espera-se uma maior dispersão da gordura do óleo de coco em solução na presença de 0.2 % de Tween 20 ou deste, nesta concentração, juntamente com baixas percentagens do emulsificante E1, caracterizado por uma mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol, e de etanol.

Tabela 2- Aparência visual e valores da absorvância medida a 502nm e da turbidez média calculada dos triplicados de emulsões do óleo de coco em água, na presença de diferentes percentagens dos emulsificantes Tween 20 (E432; T20) e mistura de ricinoleato, glicerol e propilenoglicol (E1) e/ou de etanol.

Emulsificante	Abs_{502nm} média (n=3)	Turbidez	Aparência visual
0,1% E1	1,3±0,4	3,1	Turvo
0,2% E1	1,1±0,7	2,5	Turvo/Lig. turvo
0,5% E1	1,3±0,2	3,1	Turvo
1% E1	0,9±0,2	2,0	Lig. Turvo
2% E1	0,8±0,5	1,9	Lig. Turvo
3% E1	0,4±0,3	1,0	Transparente/Lig. turvo
5% E1	1,1±0,6	2,4	Turvo
0,1% Tween 20	0,6±0,1	1,4	Turvo/Lig. Turvo
0,2% Tween 20	0,2±0,1	0,5	Transparente
0,3% Tween 20	0,5±0,2	1,1	Transparente/Turvo
0,5% Tween 20	0,5±0,3	1,1	Transparente/Lig. turvo
1% Tween 20	0,6±0,0	1,3	Lig. Turvo
0,1% Etanol	1,7±0,2	4,0	Turvo/Mt turvo
0,2% Etanol	1,6±0,1	3,6	Turvo/Lig. Turvo
0,3% Etanol	2,0±0,3	4,7	Turvo
0,5% Etanol	1,7±0,1	3,8	Turvo/Lig. Turvo
1% Etanol	1,1±0,3	2,5	Turvo/Lig. Turvo
2,5% Etanol	1,7±0,6	3,9	Turvo/Lig. Turvo
5% Etanol	2,0±0,4	4,6	Turvo
0,2% Etanol + 0,1% E1	1,7±0,8	4,0	Lig. Turvo/Turvo
0,2% Etanol + 0,2% E1	1,8±0,3	4,1	Turvo/ Lig. Turvo
0,3% Etanol + 0,1% E1	1,5±0,1	3,4	Turvo/ Lig. Turvo
0,3% Etanol + 0,2% E1	1,8±0,4	4,1	Turvo/Mt turvo
0,2% Etanol + 0,2% Tween 20	0,9±0,1	2,1	Turvo/ Lig. Turvo
0,3% Etanol + 0,2% Tween 20	1,2±0,3	2,7	Turvo/ Lig. Turvo
0,2% Etanol + 0,2% E1 + 0,2% Tween 20	2,1±0,2	4,9	Turvo/ Lig. Turvo
0,3% Etanol + 0,2% E1 + 0,2% Tween 20	2,5±0,1	5,7	Mt turvo

2. Estudos de aceitabilidade

O desenvolvimento de um produto para alimentação animal carece de uma avaliação do seu potencial *in vivo* e, ainda antes disso, de estudos preliminares da aceitabilidade deste pelos animais. Realizaram-se estudos de aceitabilidade das formulações desenvolvidas num grupo de 48 leitões, 12 animais por grupo, controlo ou com formulações com cinamaldeído, ácido láurico ou ambos estes compostos químicos. Posteriormente, foram contabilizadas as ingestões, de líquidos e sólidos, por parque, e a variação do peso individuais dos animais, ao longo do tempo. Assim, torna-se possível determinar de forma objetiva, qual o grau de aceitabilidade das diferentes formulações e, caso exista, qual a preferência entre estas, pelos leitões.

A análise dos resultados dos estudos *in vivo*, incluiu uma prévia caracterização da amostra. O grupo de animais em estudo, constituído por 24 leitões do sexo masculino e 24 do sexo feminino, foi distribuído por 24 parques, cada um composto por dois animais do sexo oposto, com a menor variação de peso possível entre estes (**Tabela 3**). Estes 24 parques foram divididos em 4 grupos de 6 parques, com 12 animais, com fornecimento dos quatro tratamentos diferentes, o grupo controlo, com fornecimento de água, e os grupos com administração das formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído ou ambos estes compostos. Este grupo de 48 animais apresenta uma idade média de 25 dias, o mesmo verificado para os leitões nos tratamentos controlo e com as formulações contendo ácido láurico e ambos os compostos antimicrobianos. Por outro lado, o grupo sujeito ao tratamento da formulação contendo apenas cinamaldeído apresenta uma idade média de 23 dias. Considerando apenas os animais do sexo feminino, verifica-se uma idade média de 25 dias para estes 24 animais e para os leitões pertencentes ao grupo controlo e ao da formulação com ácido láurico. Os animais sujeitos ao tratamento com as formulações de cinamaldeído e de cinamaldeído e ácido láurico apresentam idades médias de 23 e 26 dias, respetivamente. Por outro lado, os leitões do sexo masculino sujeitos à formulação com cinamaldeído apresentam uma idade média de 25 dias. Os leitões com os tratamentos controlo e com a formulação de ácido láurico apresentam uma idade média de 26 dias, enquanto que os animais com o tratamento com a formulação com ambos os compostos apresentam uma idade média de 24 dias. Para além das idades, avaliou-se os pesos iniciais dos leitões, através das suas pesagens, no dia 0 de estudo. Após a pesagem destes, obtiveram-se valores de pesos iniciais médios de 8,78 kg, contabilizando os 48 animais, e de 8,55 kg, 8,69 kg, 8,86 kg e

8,78 kg para os leitões pertencentes aos tratamentos controle e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos estes compostos, respetivamente (**Tabela 3**). Tendo em conta a diferenciação de sexo, verifica-se uma média dos pesos iniciais dos animais do sexo feminino de 8,80 kg, 8,48 kg, 8,73 kg, 9,10 kg e 8,78 kg, considerando estes 24 animais e os animais pertencentes aos grupos controle e com fornecimento das formulações de ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Por outro lado, considerando apenas os leitões do sexo masculino, verificam-se pesos iniciais médios de 8,59 kg, 8,71 kg, 8,59 kg, 8,23 kg e 8,64 kg, destes 24 animais e dos animais pertencentes aos grupos controle e com fornecimento das formulações de ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente (**Tabela 3**). Ainda, os animais com 23 dias, apresentaram um peso inicial médio de 8,08 kg, 8,22 kg, 8,31 kg, 7,81 kg e 8,02 kg, considerando a totalidade destes animais e os animais no grupo controle e com tratamento com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Os animais com 25 dias, caracterizavam-se por pesos iniciais médios de 8,98 kg, 8,87 kg, 7,81 kg, 9,64 kg e 8,64 kg e com 27 dias por pesos médios de 9,20 kg, 9,00 kg, 8,91 kg, 9,46 kg e 9,20 kg, considerando todos estes animais e os pertencentes aos grupos controle e com tratamento com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente (**Tabela 4**). Por fim, existia apenas um animal com 31 dias de idade, pertencente ao grupo controle, com um peso inicial de 6,63 kg. Assim, tendo em conta estas variações de idades e de pesos iniciais dos leitões nos vários tratamentos e, dentro destes, para os diferentes sexos, foi importante avaliar a influência da idade, do sexo e dos pesos iniciais dos animais nas suas ingestões de líquidos e sólidos diárias e nas variações de peso nos dias 0, 3, 7 e 14 dias de estudo.

Tabela 3- Caracterização estatística descritiva dos animais como um único grupo ou por discriminação de sexo, analisando por tratamento ou no total, em termos de idade média (dias) e peso inicial médio (kg).

Grupo de estudo	Tratamento	Idade média (dias)	Idade média por grupo (dias)	Peso inicial médio (kg)	Peso inicial médio por grupo (kg)
Totalidade dos animais	Controlo	25±1	25±2	8,55±1,08	8,78±0,93
	Formulação Ácido Láurico	25±2		8,69±1,03	
	Formulação Cinamaldeído	23±2		8,86±0,89	
	Formulação Cinamaldeído + Ácido Láurico	25±2		8,78±0,81	
Sexo feminino	Controlo	25±2	25±2	8,48 ±0,79	8,80±0,76
	Formulação Ácido Láurico	25±2		8,73±0,85	
	Formulação Cinamaldeído	23±1		9,10±0,79	
	Formulação Cinamaldeído + Ácido Láurico	26±2		8,78±0,73	
Sexo masculino	Controlo	26±3	25±2	8,71 ±1,38	8,59±1,07
	Formulação Ácido Láurico	26±2		8,59±1,26	
	Formulação Cinamaldeído	25±2		8,23±0,97	
	Formulação Cinamaldeído + Ácido Láurico	24±2		8,64±0,89	

Tabela 4- Caracterização estatística descritiva dos animais por discriminação de idades, aquando do início do estudo, de 23, 25 ou 27 dias, analisando o peso inicial médio (kg) por tratamento ou na totalidade dos animais, por idade. Todos estes resultados não são estatisticamente diferentes ($p>0.05$).

Idade dos animais (dias)	Tratamento	Peso inicial médio (kg)	Peso inicial médio por idade (kg)
23	Controlo	8,22±0,54	8,08±0,88
	Formulação Ácido Láurico	8,31±1,26	
	Formulação Cinamaldeído	7,81±0,75	
	Formulação Cinamaldeído + Ácido Láurico	8,02±1,01	
25	Controlo	8,87±0,40	8,98 ±0,85
	Formulação Ácido Láurico	7,81±1,29	
	Formulação Cinamaldeído	9,64±0,43	
	Formulação Cinamaldeído + Ácido Láurico	8,64±0,48	
27	Controlo	9,00±1,51	9,20±0,80
	Formulação Ácido Láurico	8,91±0,63	
	Formulação Cinamaldeído	9,46±0,37	
	Formulação Cinamaldeído + Ácido Láurico	9,20±0,61	

A análise estatística dos resultados das ingestões de sólidos e líquidos, determinadas por parque, foi realizada, inicialmente, considerando os 48 animais, mas também separando os resultados por idade média, por parque, e por peso inicial combinado dos leitões, por parque. Os resultados destes dois parâmetros, medidos *in vivo*, não foram avaliados consoante o sexo do animal, uma vez que cada parque apresentava dois animais do sexo oposto. Analisando as ingestões de líquidos (**figura 1**), no dia 1 de estudo, verificaram-se ingestões médias de água e das formulações com ácido láurico, com cinamaldeído ou com ambos, por parque, de 0,502 L, 0,405 L, 0,567 L e 0,369 L, respetivamente. No segundo dia de estudo, estas ingestões foram de 0,577 L, 0,700 L, 0,841 L e 0,594 L, respetivamente, e no terceiro dia foram de 0,644 L, 0,648 L, 1,006 L, 0,747 L, respetivamente, para esta mesma ordem de tratamentos. Desta análise, verificou-se que as ingestões diárias não diferiram das do grupo controlo, ao longo destes três dias, para as formulações, contendo ácido láurico

($p=0,972$), cinamaldeído ($p= 0,364$) e ambos ($p=0,979$). Estas ingestões também não diferiram entre formulações, com valor de p de 0,610, 1,000 e 0,586, comparando os grupos com ácido láurico com os com cinamaldeído e ambos os compostos e comparando estes dois últimos, respetivamente. Contabilizando o somatório das ingestões médias de líquidos (**figura 2**), nestes três dias de estudo, obtiveram-se valores de 1,50 L, 2,01 L, 2,32 L e 1,65 L, para os grupos controlo e com administração da formulação contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Avaliando estatisticamente estas ingestões médias totais de líquidos, verificaram-se valores constantes destas entre os vários tratamentos, ao longo do tempo ($p>0,05$). Assim sendo, em termos de aceitabilidade, as várias formulações do produto desenvolvido, são tanto aceitáveis quanto a água, pelos leitões nos três dias exatamente após o desmame. Seria de esperar uma aceitabilidade superior do produto relativamente à água, tendo em conta a doçura deste, com presença de palatibilizantes e de glucose, e as suas características organolépticas apelativas, derivadas, em parte, pelo óleo de coco. No entanto, a acidificação destes com a mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos e o cheiro característico a canela do cinamaldeído poderiam favorecer a sua rejeição pelos animais. Apesar de não se ter verificado discrepância entre os tratamentos com as formulações do produto e o controlo, a rejeição destas formulações não foi verificada. Nos primeiros dias após o desmame são esperadas ingestões muito baixas tanto de líquidos como de ração sólida, graças ao stress sentido pelos animais nesta fase do desenvolvimento animal, tendo-se verificado ingestões das formulações até inferiores ao proposto de 0,5 L/dia.

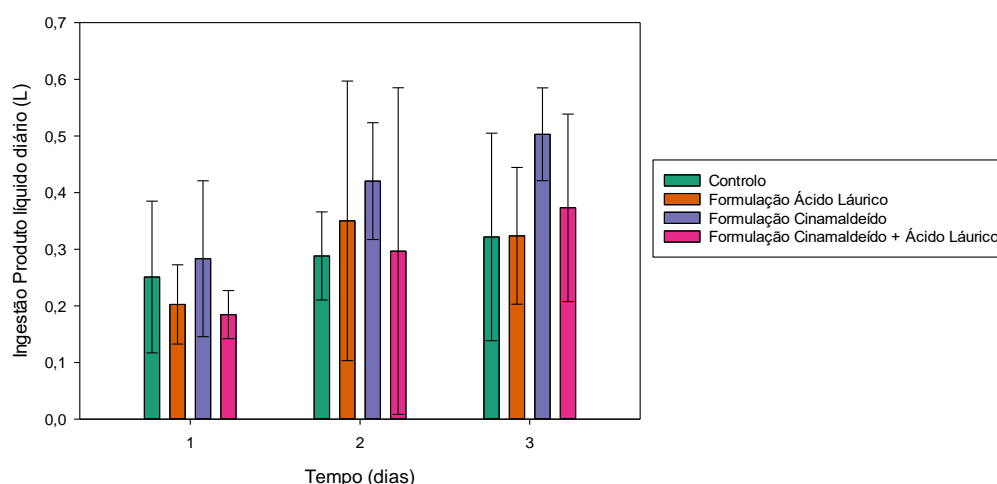


Figura 1- Valores ingestão diária média de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando os 48 animais. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

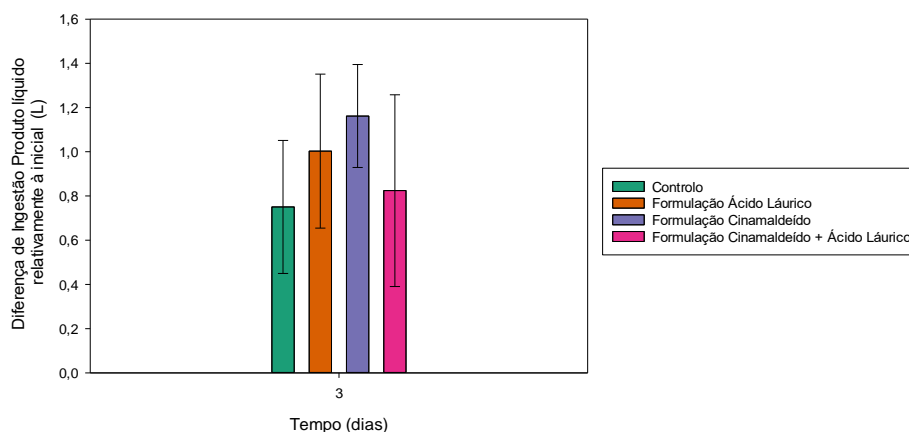


Figura 2- Valores de ingestão média total de líquidos, após os três dias de administração, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os 48 animais. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

O consumo de ração sólida diária também foi analisado estatisticamente, primeiro considerando os 48 animais e, seguidamente, agrupando-os consoante as idades médias por parque e os pesos combinados por parque. Através da análise dos resultados (**figura 3**), verificou-se ausência de ingestão de ração pelos leitões nos diferentes grupos no primeiro dia de estudo, no entanto estes começaram a ingerir pequenas quantidades após o segundo dia. No segundo dia de estudo, verificou-se para o grupo controlo e para os grupos com administração das formulações contendo óleo de coco, cinamaldeído ou ambos, ingestões médias de ração sólida por parque de 0,16 kg, 0,20 kg, 0,16 kg e 0,15 kg, respetivamente. No dia três de estudo, estas ingestões foram igualmente baixas para todos os grupos, de 0,14 kg, 0,23 kg, 0,01 kg e 0,18 kg, respetivamente. Em termos estatísticos, estas ingestões médias diárias de ração sólida para os grupos com administração das formulações contendo ácido láurico ($p=0,942$), cinamaldeído ($p=0,430$) e ambos ($p=0,684$), não diferem dos respetivos controlos, ao longo do tempo. No entanto, verifica-se uma diferença estatística nestas ingestões comparando os grupos com fornecimento da formulação contendo cinamaldeído e da formulação com ácido láurico ($p<0,05$), no dia 3 de estudo. Contabilizando o somatório das ingestões médias de sólidos (**figura 4**), este foi de 0,32 kg, 0,43 kg, 0,18 kg e 0,19 kg, para os grupos controlo e com administração da formulação contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Através da análise estatística das ingestões médias totais de ração, verificaram-se valores constantes destas entre tratamentos, ao longo do tempo ($p>0,05$), exceto comparando as ingestões de ração sólida

diária dos animais sujeitos à formulação de cinamaldeído e à formulação de ácido láurico, no dia 3 de estudo ($p < 0,05$). Assim, através da análise destes dados, constata-se que as ingestões diárias e totais nestes três dias de estudo, de sólidos, nos grupos com administração das formulações desenvolvidas, não diferem estatisticamente das ingestões verificadas para o grupo controlo. No entanto, estas ingestões são estatisticamente diferentes entre os grupos sujeitos às formulações com cinamaldeído e com ácido láurico.

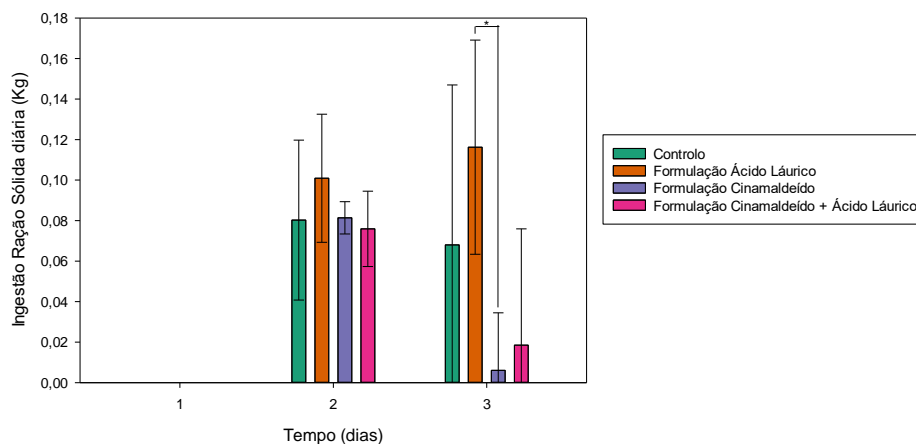


Figura 3- Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando os 48 animais. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), exceto comparando as ingestões médias diárias de ração sólida dos animais sujeitos à formulação de cinamaldeído e sujeitos à formulação de ácido láurico, no dia 3 de estudo ($*p < 0,05$).

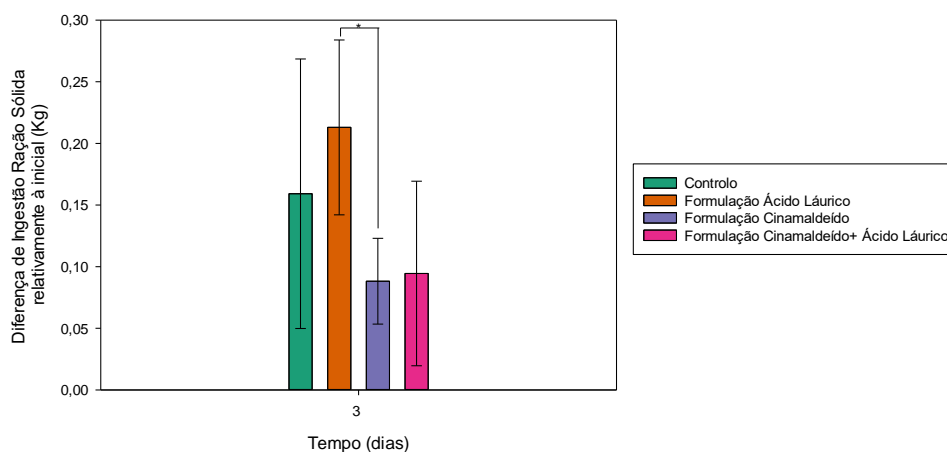


Figura 4- Valores de ingestão média total de ração sólida, após os três dias de administração, em percentagem, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os 48 animais. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), exceto comparando as ingestões médias totais de ração sólida dos animais sujeitos à formulação de cinamaldeído e à formulação de ácido láurico ($*p < 0,05$).

A análise da variação do peso dos animais foi realizada por pesagem dos animais ao fim de 3, 7 e 14 dias de estudo, para além dos pesos iniciais, já descritos anteriormente. Os resultados obtidos foram avaliados considerando inicialmente os 48 animais, mas também separadamente por idade, peso inicial e sexo dos leitões. Considerando os 48 animais (**figura 5**), no dia 3 de estudo, os pesos médios dos leitões, aos quais foi disponibilizada água ou as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído ou ambos foram de 8,41 kg, 8,62 kg, 8,60 kg e 8,78 kg, respetivamente. Após 7 dias, os pesos verificados foram de 8,65 kg, 9,87 kg, 8,36 kg, 9,70 kg, enquanto que, passados 14 dias de estudo foram de 11,49 kg, 12,90 kg, 10,69 kg, 11,99 kg, respetivamente, para esta mesma ordem de tratamentos. Através da análise estatística destes resultados, constatou-se uma ausência de variação de peso, durante estes 14 dias, para as formulações de ácido láurico ($p=0,918$), cinamaldeído ($p=0,921$) e ambos ($p=1,000$), comparativamente ao grupo controlo. Entre formulações estas variações também foram constantes ao longo do tempo, com valores de p de 0,584, 0,889 e 0,889, comparando a formulação contendo ácido láurico com as formulações contendo cinamaldeído e ambos os compostos e comparando estes dois últimos, respetivamente. Assim, verifica-se a ausência de variação de peso nos animais, ao longo do estudo, e ausência de discrepância entre os efeitos dos diferentes tratamentos no desempenho do animal.

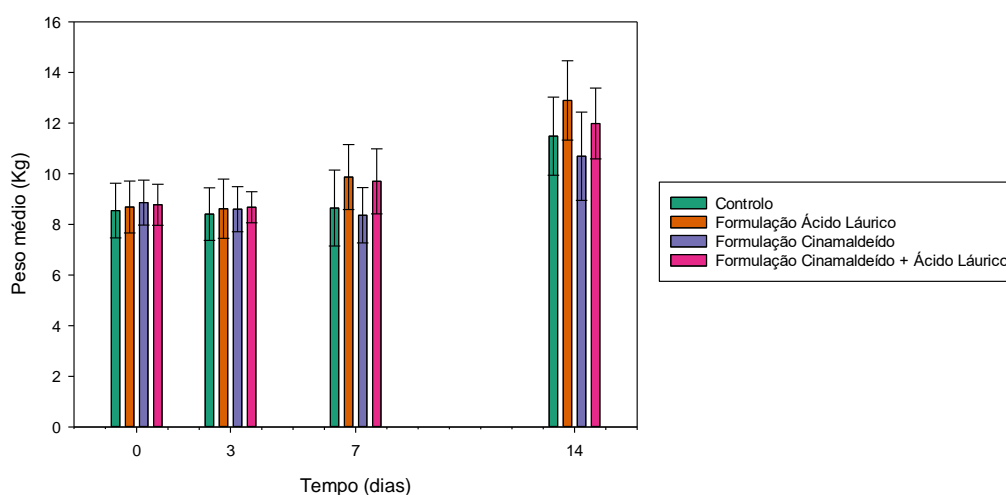


Figura 5- Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os 48 animais. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

A incidência de DPD foi avaliada, por observação do número de casos de diarreia, ao longo do estudo. No início do estudo, dos 48 animais, obtidos à suinicultura Reis&Silva Lda., apenas se verificaram dois casos de diarreia à chegada às instalações da UTAD. Destes dois casos, um dos animais apresentava um peso inicial de 9,15 kg, enquanto que o outro animal apresentava uma aparência pálida, indicativa de anemia, e um peso inicial de 8,32 kg. Relativamente ao animal com indícios de anemia, esta fêmea apresentava 23 dias de idade e foi distribuída para um parque com o tratamento com a formulação de cinamaldeído, realizando-se a observação constante do seu desempenho ao longo do estudo. Por outro lado, o animal com 9,15 kg, macho, apresentava 25 dias de idade e foi distribuído para um parque pertencente ao grupo controlo. No primeiro dia de estudo, verificou-se, de uma forma geral, uma manutenção desta incidência de DPD, associada a uma ausência de ingestão de sólidos e baixa ingestão de líquidos. No primeiro dia de estudo, no parque, onde se encontrava o animal com indícios de anemia, verificaram-se ingestões de líquidos de 0,48 L, enquanto que o outro animal pertencia a um parque, onde foram contabilizadas ingestões de líquidos de 0,20 L. No segundo dia de estudo, esta incidência de DPD tendeu a aumentar, associada ao início da ingestão de ração pelos animais. No terceiro dia de estudo, aquando da pesagem dos animais, foi contabilizada novamente a incidência de DPD, verificando-se um aumento desta para 8 casos dos 48 animais em estudo. Destes 8 casos, para além dos dois inicialmente descritos, verificou-se a ocorrência de diarreia em três casos sujeitos à formulação contendo ácido láurico e cinamaldeído, dois deles pertencentes ao mesmo parque, dois casos com tratamento com a formulação de cinamaldeído e um caso com administração da formulação de ácido láurico. Para estes 8 casos, verificaram-se ingestões médias de líquidos de 0,20L, 0,44 L, 0,41 L e 0,41 L, para os grupos controlo e com as formulações de ácido láurico, cinamaldeído e ambos estes compostos, respetivamente, no dia 1 de estudo. Estas ingestões foram de 0,71 L, 0,74 L, 0,81 L e 0,78 L, no dia 2, e de 0,66 L, 0,98 L, 1,01 L e 0,81 L, no dia 3 de estudo, para os grupos controlo e com as formulações de ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Relativamente às ingestões médias de ração, estas foram nulas para todos os tratamentos, no dia 1 de estudo. Por outro lado, estas ingestões foram de 0,32 kg, 0,27 kg, 0,16 kg e 0,15 kg, no dia 2 de estudo, e de 0,32 kg, 0,23 kg, 0,02 kg e 0,02 kg, no dia 3 de estudo, para os grupos controlo e com as formulações de ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Por fim, os pesos médios iniciais destes leitões foram de 9,15 kg, 8,03 kg, 8,32 kg e 9,33 kg, no dia 1 de estudo, e de 9,25 kg, 7,81 kg, 7,90 kg e 8,76 kg, no

dia 3 de estudo, para os tratamentos controle e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos estes compostos, respectivamente (**tabela 5**). Através da análise estatística destes resultados, para os leitões apresentando diarreia ao terceiro dia de estudo, verificou-se ausência de alterações nas ingestões de líquidos e dos pesos dos leitões, entre diferentes tratamentos ($p>0,05$). No entanto, as ingestões de sólidos demonstraram-se diferentes, comparando os grupos controle e com administração da formulação contendo ácido láurico com o grupo com administração da formulação contendo cinamaldeído ($p<0,05$). No quarto dia de estudo, a incidência de diarreia decresceu para apenas dois casos, com fornecimento da formulação de cinamaldeído, um deles correspondendo ao animal com indícios de anemia e o outro animal, sem ocorrência anterior de diarreia, mas compartilhando o parque com um dos casos anteriores, podendo ter sido contaminado e apresentar, posteriormente, manifestação deste sintoma da DPD. O aumento da incidência de diarreia após o início de ingestão de ração sólida é esperado, uma vez que estes animais apresentam um trato gastrointestinal imaturo, sem capacidade de digestão dos alimentos e absorção dos seus nutrientes a nível intestinal. Assim, verificam-se ingestões de líquidos e sólidos muito baixas nesta fase do desenvolvimento animal. No entanto não verifica qualquer mortalidade e a incidência de DPD, apesar de aumentada após o início da ingestão de sólidos, demonstrou-se controlada, de uma forma geral, logo no dia seguinte. Estas ingestões baixas de ração demonstram ser ainda inferiores para os animais sujeitos à formulação de cinamaldeído, em ambos os dias 2 e 3 de estudo, relativamente ao controle e à formulação com ácido láurico. No entanto, não existe influência do tratamento nas ingestões de líquidos, nestes animais.

Tabela 5- Valores de ingestões médias de líquidos e sólidos e Pesos médios nos dias 1, 2 e/ou 3 de estudo, para os diferentes tratamentos, considerando os 8 casos de diarreia no dia 3 de estudo. Destes 8 casos, 3 estão sujeitos à formulação de cinamaldeído, 3 sujeitos à formulação de cinamaldeído e ácido láurico, 1 pertencente ao grupo controlo e 1 com fornecimento da formulação contendo apenas ácido láurico. ^ap<0,05, as ingestões médias de ração são diferentes entre o grupo controlo e o grupo com a administração da formulação contendo cinamaldeído, nos dias 2 e 3 de estudo. ^bp<0,05, as ingestões médias de ração são diferentes entre os grupos com administração das formulações contendo apenas ácido láurico e apenas cinamaldeído, nos dias 2 e 3 de estudo. Todos os restantes valores não são estatisticamente diferentes (p>0,05).

Parâmetro <i>in vivo</i>	Tratamento	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Ingestão média de líquidos (L)	Controlo	0,20	0,71	0,66
	Formulação Ácido Láurico	0,45	0,74	0,98
	Formulação Cinamaldeído	0,42±0,17	0,81±0,06	1,01±0,07
	Formulação Ácido Láurico + Cinamaldeído	0,41±0,06	0,78±0,86	0,81±0,62
Ingestão média de ração (kg)	Controlo	0	0,32 ^a	0,32 ^a
	Formulação Ácido Láurico	0	0,27 ^b	0,23 ^b
	Formulação Cinamaldeído	0	0,16±0,00 ^{a b}	0,02±0,03 ^{a b}
	Formulação Ácido Láurico + Cinamaldeído	0	0,15±0,01	0,02±0,02
Peso médio (kg)	Controlo	9,15	-	9,25
	Formulação Ácido Láurico	8,03	-	7,81
	Formulação Cinamaldeído	8,32±0,97	-	7,90±1,10
	Formulação Ácido Láurico + Cinamaldeído	9,33±1,40	-	8,76±0,58

O sexo dos leitões pode influenciar o desempenho destes no estudo. Desta forma, as medidas do peso dos leitões ao longo do tempo foram avaliadas estatisticamente, separando os animais consoante do seu sexo. Através da análise dos resultados da **figura 6A**, verifica-se que no dia 3 de estudo, os pesos médios dos leitões do sexo feminino, aos quais foi disponibilizada água ou as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído ou ambos foram de 8,07 kg, 8,80 kg, 8,96 kg e 8,72 kg, respetivamente. Após 7 dias, os pesos verificados foram de 8,47 kg, 9,94 kg, 8,76 kg e 9,97 kg, enquanto que, passados 14 dias de estudo foram de 11,49 kg, 12,79 kg, 11,82 kg e 12,15 kg, respetivamente. Relativamente o

sexo masculino (**figura 6B**), os pesos médios dos leitões, aos quais foi disponibilizada água ou as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído ou ambos, foram de 8,72 kg, 8,62 kg, 8,20 kg e 8,68 kg, respetivamente, no dia 3 de estudo. Após 7 dias, os pesos verificados foram de 9,14 kg, 9,83 kg, 8,36 kg e 9,06 kg, respetivamente, e passados 14 dias de estudo foram de 12,11 kg, 12,90 kg, 10,40 kg, 11,37 kg, respetivamente. Não foi avaliada a influência do sexo nas ingestões de líquidos e de sólidos, uma vez que estas foram contabilizadas por parque, contendo sempre dois animais de sexos opostos, com a menor variação de peso possível entre eles. Através da análise estatística destes resultados, verificou-se que o peso médio dos animais não difere entre tratamentos e ao longo do tempo, mesmo analisando os pesos médios por sexo. No sexo feminino, os valores de p, obtidos a partir da análise estatística foram de 0,825, 0,995 e 0,927, para as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente, comparativamente ao grupo controlo. Para além disso, comparando as diferentes formulações, obtiveram-se valores de p de 0,927, 0,995 e 0,983, comparando a formulação contendo ácido láurico com as contendo cinamaldeído e ambos os compostos e comparando estas duas últimas, respetivamente. Nos animais do sexo masculino, os pesos das formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, comparando com o controlo, apresentam valores de p de 1,000, 0,750, 0,978, respetivamente. Ainda, estes valores foram de 0,696, 0,960 e 0,930, comparando a formulação contendo ácido láurico com as contendo cinamaldeído e ambos os compostos e comparando estas duas últimas, respetivamente. Assim, demonstra-se que, neste estudo, o desempenho dos leitões não se diferencia entre formulações, nem comparativamente ao controlo, e o peso destes não demonstra ser afetado pelo sexo do animal. No entanto, as variações de peso refletem as ingestões de líquidos e sólidos dos leitões e, como estas últimas, foram contabilizadas por parque, contendo sempre dois leitões do sexo oposto, esta influência do sexo poderá não ser tão acentuada neste estudo.

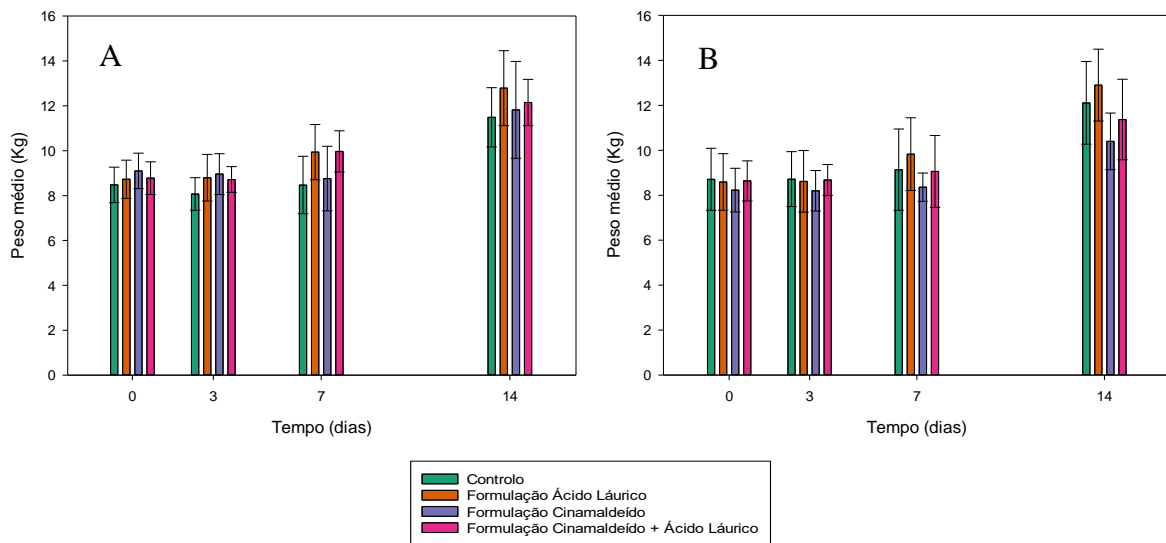


Figura 6 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os animais do sexo feminino (A) e masculino (B). Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

Neste estudo, a idade dos leitões, de 23, 25, 27 ou 31 dias, pode também influenciar o desempenho do animal. Desta forma, as medidas do peso dos leitões ao longo do tempo foram avaliadas estatisticamente, separando os animais consoante a sua idade. Avaliando a influência da idade dos leitões nas medições do peso destes, ao longo do tempo, verificou-se, no dia 3 de estudo, pesos médios dos leitões com 23 dias de idade (**figura 7**), aos quais foi disponibilizada água ou as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído ou ambos foram de 7,89 kg, 8,27 kg, 7,70 kg e 7,88 kg, respetivamente. No dia 7, os valores obtidos foram de 8,27 kg, 9,39 kg, 7,84 kg e 8,06 kg, enquanto que no dia 14 foram de 10,43 kg, 12,27 kg, 10,22 kg e 10,12 kg, respetivamente. Para os animais com 23 dias, os pesos não variaram, ao longo do tempo, comparando as formulações contendo ácido láurico ($p=0,719$), cinamaldeído ($p=0,981$) e ambos ($p=1,000$) com o grupo controlo, e comparando a formulação com o ácido láurico com as formulações com cinamaldeído ($p=0,357$) e ambos os compostos ($p=0,593$) e comparando os pesos destas últimas duas ($p=0,983$). Por outro lado, os animais com 25 dias (**figura 8**), aos quais foi disponibilizada água ou as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído ou ambos, apresentaram valores de pesos médios de 8,99 kg, 8,42 kg, 9,47 kg e 9,31 kg, respetivamente, no dia 3 de estudo. Ao sétimo dia de estudo, verificaram-se pesos médios de 10,11 kg, 10,04 kg, 10,36 kg e 10,05 kg, respetivamente e no dia 14 de 13,29 kg, 13,04 kg, 13,74 kg e 12,41 kg, respetivamente. Para

estes animais, os pesos não variaram, ao longo do tempo, comparando as formulações contendo ácido láurico ($p=0,866$), cinamaldeído ($p=0,879$) e ambos ($p=1,000$) com o grupo controlo, e comparando a formulação com o ácido láurico com as formulações com cinamaldeído ($p=0,568$) e ambos os compostos ($p=0,902$) e comparando os pesos destas últimas duas ($p=0,927$). Ainda, os animais com 27 dias (**figura 9**), apresentaram valores de pesos médios de 8,47 kg, 9,05 kg, 8,96 kg e 8,60 kg, respetivamente, no dia 3. Estes valores foram de 9,48 kg, 10,04 kg, 8,99 kg e 9,98 kg, respetivamente no dia 7 e 12,49 kg, 12,95 kg, 11,98 kg e 12,38 kg, respetivamente, no dia 14 de estudo. Para estes animais, os pesos também não variaram, ao longo do tempo, comparando as formulações contendo ácido láurico ($p=0,958$), cinamaldeído ($p=0,958$) e ambos ($p=0,996$) com o grupo controlo, e comparando a formulação com o ácido láurico com as formulações com cinamaldeído ($p=0,764$) e ambos os compostos ($p=0,990$) e comparando os pesos destas últimas duas ($p=0,887$). Por fim, esta análise não foi possível ser avaliada para os 31 dias, uma vez que apenas um animal apresentava esta idade, pertencente ao grupo controlo, com pesos de 6,63 kg, 6,23 kg, 7,04 kg e 10,21 kg, nos dias 0, 3, 7 e 14 de estudo. Assim, constata-se que as idades dos animais não influenciam a análise dos resultados, obtendo-se ausência de discrepância entre os pesos das formulações e comparativamente ao controlo, tal como verificado através da análise inicial com os resultados dos 48 animais.

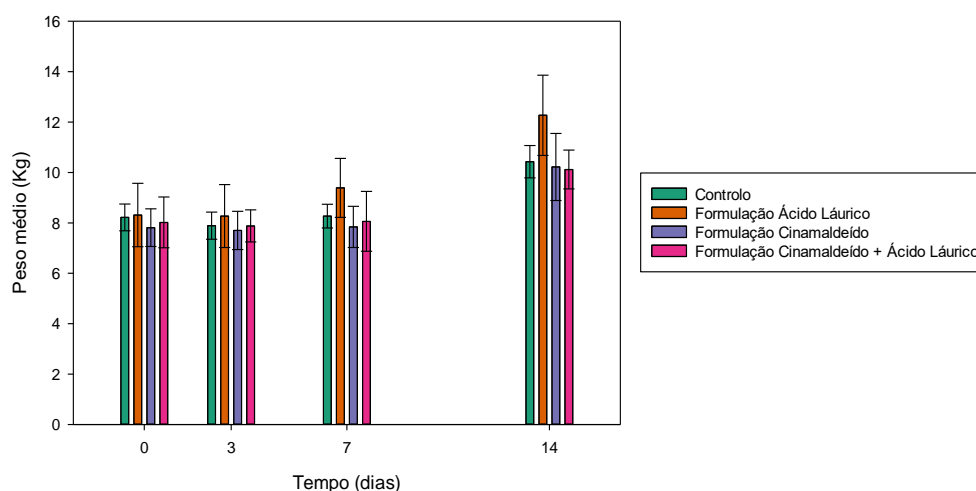


Figura 7 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando apenas os animais com 23 dias de idade. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

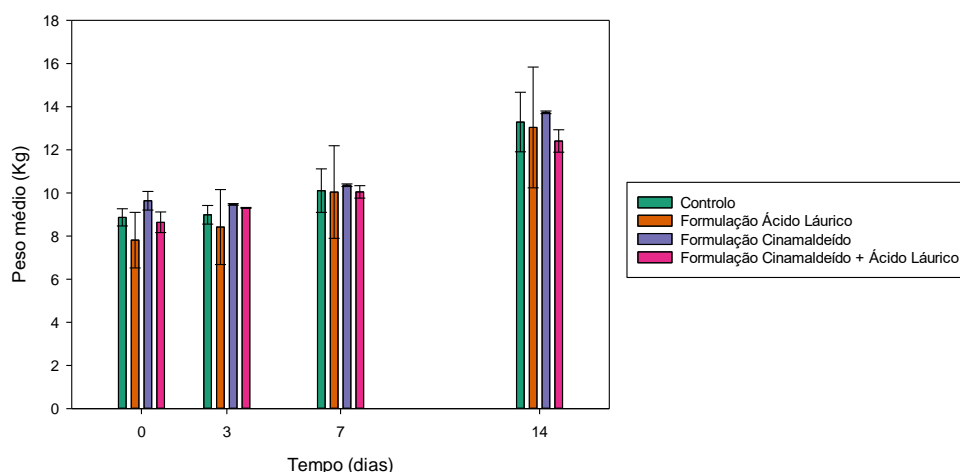


Figura 8 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando apenas os animais com 25 dias de idade. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

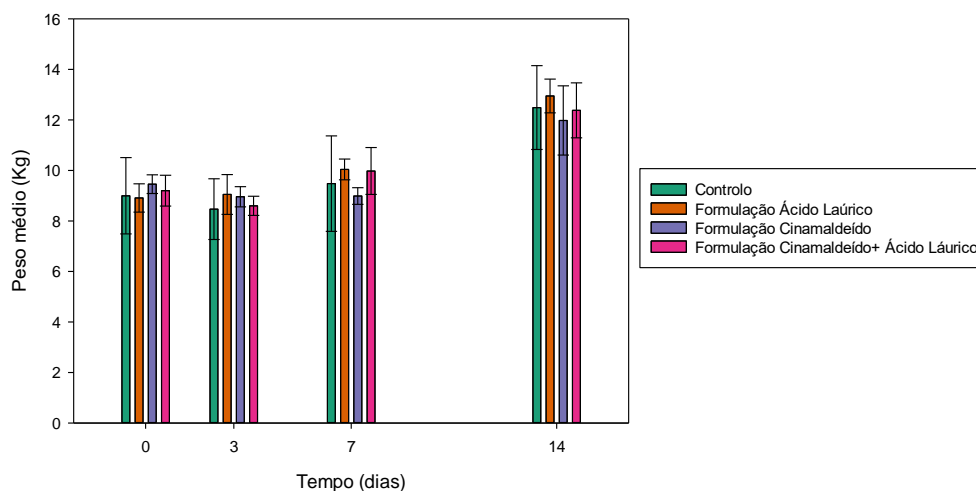


Figura 9 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de cosco ou com ambos, considerando apenas os animais com 27 dias de idade. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

A análise da influência das idades dos animais das variações de pesos, ao longo do tempo, também foi realizada com o agrupamento das idades dos 23 aos 25 e dos 27 aos 31, de forma a que o animal com 31 dias também pode-se ser contabilizado. Os animais com idades compreendidas entre os 23 e os 25 dias (**figura 10A**), apresentaram pesos médios dos leitões de 8,74 kg, 8,08 kg, 8,32 kg e 8,30 kg no início do estudo, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinnamaldeído e ambos, respetivamente. Por outro lado, os leitões com idades entre os 27 e 31 dias (**figura 10B**), obtiveram-se valores

de pesos médios dos leitões de 8,36 kg, 8,91 kg, 9,46 kg e 9,20 kg, no início do estudo. No dia 3, estes pesos foram de 8,55 kg, 8,08 kg, 8,32 kg e 8,30 kg para leitões com 23 a 25 dias e de 8,47 kg, 9,05 kg, 8,96 kg e 8,60 kg para os leitões com 27 a 31 dias, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Ao sétimo dia de estudo, os leitões apresentaram pesos de, 8,68 kg, 9,70 kg, 10,36 kg e 8,56 kg, com idade entre 23 e 25 dias, e de 8,28 kg, 10,04 kg, 8,99 kg e 9,98 kg, com idade entre 27 e 31 dias, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Por fim, no dia 14 de estudo, estes animais já demonstraram pesos médios de 11,45 kg, 13,04 kg, 10,59 kg, 10,70 kg, com idade de 23 a 25 dias, e 11,52 kg, 12,95 kg, 11,98 kg e 12,38 kg, com idades entre 27 e 31 dias, para estas mesmas formulações, respetivamente. Assim, através da análise destes dados, verificou-se que tanto analisando os pesos médios por sexo, como por idade dos animais, os pesos não são significativamente diferentes entre grupos, ao longo do tempo. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que as ingestões de líquidos e sólidos foram muito baixas. Assim, demonstra-se que ambos os tratamentos, incluindo a água, apresentam um efeito semelhante no desempenho do animal durante 14 dias.

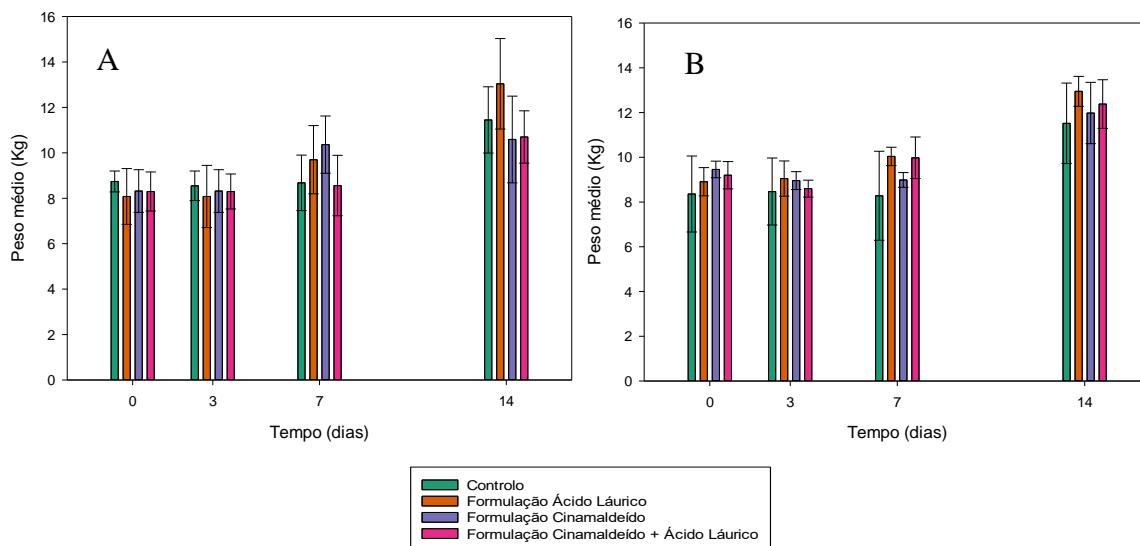
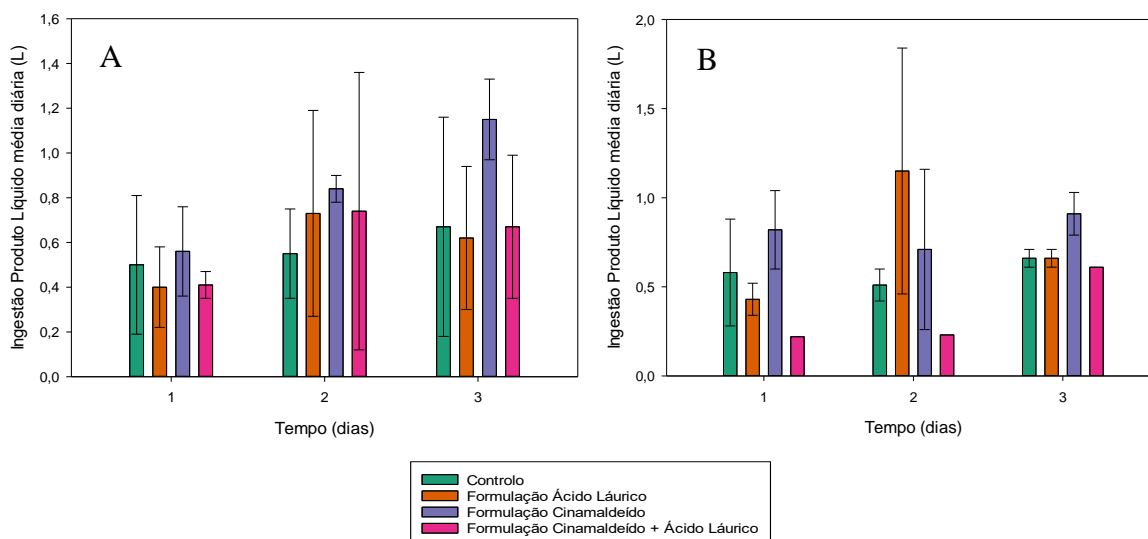


Figura 10 – Valores dos pesos médios dos leitões, em kg, no início do estudo e após 3, 7 e 14 dias de administração de água (controlo) e das formulações com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, considerando os animais com idades compreendidas entre os 23 e 25 dias (A) e os 27 e 31 dias (B). Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

A influência da idade combinada por parque dos leitões nas ingestões tanto de líquidos como de sólidos pelos animais, também foi avaliada. A amostra estudada apresentava 5, 1, 11, 4, 2 e 1 leitões com idades médias por parque de 23, 24, 25, 26, 27 e 29 dias, respetivamente. De forma a analisar amostras significativas, estas idades combinadas foram agrupadas em dois grupos, um dos 23 aos 25 dias e outro dos 26 aos 29 dias de idade. Os parques de leitões com idades médias compreendidas entre os 23 e 25 dias (**figura 11A**), apresentaram valores de ingestão de líquidos médios de 0.50L, 0.40L, 0.56L, 0,41 L, no dia 1, de 0,55 L, 0,73 L, 0,84 L e 0,74 L, no dia 2 e de 0,67 L, 0,62 L, 1,15 L e 0,67 L, no dia 3, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Por outro lado, os parques com leitões com idades médias entre 26 e 29 dias (**figura 11B**), apresentaram valores de ingestão de líquidos médios de 0,58 L, 0,43 L, 0,82 L e 0,22 L, no dia 1, de 0,51 L, 1,15 L, 0,71 L e 0,23 L, no dia 2 e de 0,66 L, 0,66 L, 0,91 L e 0,61 L, no dia 3, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Através da análise estatística destes resultados, verificou-se que, para os animais com idades, por parque, entre 23 e 25 dias, as ingestões de líquidos não diferiram comparando o controlo com as formulações de ácido láurico ($p=1,000$), cinamaldeído ($p=0,521$) e ambos ($p=0,998$). Ainda, os resultados também não se diferenciam, comparando as ingestões da formulação de ácido láurico com as formulações de cinamaldeído ($p=0,542$) e ambos os compostos ($p=0,999$) e destas últimas duas formulações ($p=0,618$). O mesmo foi verificado para os animais com idades médias, por parque, entre 26 e 29 dias ($p>0,05$). Relativamente às ingestões de sólidos, a análise dos resultados foi procedida da mesma forma que para os líquidos. No início do estudo, não foi avaliada a influência das idades médias dos leitões, por parque, nas ingestões de sólidos, uma vez que estas foram nulas para ambos os grupos em estudo. Os parques, contendo leitões com idades médias compreendidas entre os 23 e 25 dias (**figura 12A**), apresentaram valores de ingestão de ração médios de 0,23 kg, 0,24 kg, 0,16 kg e 0,17 kg, no dia 2 e de 0,15 kg, 0,16 kg, 0,02 kg e 0,10 kg, no dia 3, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Por outro lado, os parques com leitões com idades médias, por parque, entre 26 e 29 dias (**figura 12B**), apresentaram valores de ingestão média de ração de 0,14 kg, 0,17 kg, 0,18 kg e 0,14 kg, no dia 2 e de 0,16 kg, 0,26 kg, 0,08 kg e 0,00 kg, no dia 3, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Estes resultados, obtidos para os animais

com idades médias entre os 23 e 25 dias, demonstram ausência de discrepância entre ingestões de sólidos para as formulações de ácido láurico ($p=0,999$), cinamaldeído ($p=0,454$) e ambos ($p=0,808$), comparando com o controle, e também comparando a primeira formulação com a segunda ($p=0,384$) e a terceira ($p=0,733$) e comparando estas duas últimas ($p=0,891$). A mesma ausência de discrepância nas ingestões de sólidos, ao longo do tempo, para as diferentes formulações também foi verificada para os animais com idades entre os 26 a 29 dias ($p>0,05$). Assim, verifica-se que as ingestões de líquidos e sólidos continuam a não variar entre tratamentos ao longo do tempo, mesmo após a análise por idades médias, por parque, dos leitões. Assim, demonstra-se que neste estudo, as medidas não parecem depender da idade dos leitões e que a aceitabilidade das várias formulações é igual ao controle, apesar de não existir rejeição destas.



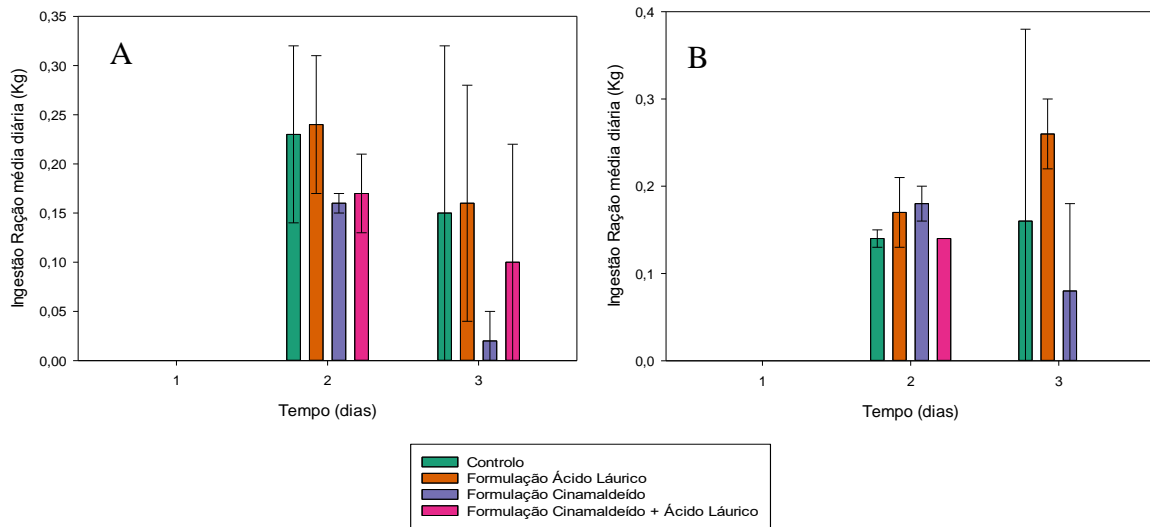


Figura 12 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando idades médias por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidas entre 23 e 25 dias (A) e 26 e 29 dias (B). Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

Por fim, foi avaliada, para além da idade, a influência do peso inicial dos leitões nas ingestões de líquidos e sólidos por estes. Uma vez que estas medidas foram realizadas por parque, avaliou-se a influência dos pesos combinados iniciais dos leitões, por parque, nestas ingestões, ao longo do tempo. Obtiveram-se diversos valores de pesos combinados, compreendidos entre 14,00 kg e 20,72 kg, que foram agrupados em três grupos, de 14,00 kg a 16,50 kg, de 16,50 kg a 19,00 kg e de 19,00 kg a 21,50 kg. Para os leitões com pesos combinados, por parque, de 14,00 a 16,50 kg (**figura 13**), obtiveram-se valores de ingestão de líquidos médios de 0,83 L, 0,34 L, 0,32 L e 0,42 L, no dia 1, de 0,62 L, 0,53 L, 0,79 L e 0,99 L, no dia 2 e de 1,03 L, 0,59 L, 1,00 L e 0,83 L, no dia 3, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinnamaldeído e ambos, respetivamente. Por outro lado, para pesos combinados por parque de 16,50 kg até 19,00 kg (**figura 14**), verificaram-se valores de 0,37 L, 0,38 L, 0,62 L e 0,39 L, no dia 1, de 0,51 L, 0,93 L, 0,71 L e 0,79 L, no dia 2, de 0,44 L, 0,66 L, 1,09 L e 0,75 L, no dia 3, para estes mesmos grupos nesta mesma ordem. Ainda, para pesos combinados entre 19,00 kg e 21,50 kg (**figura 15**), constataram-se valores de ingestões de líquidos de 0,36 L, 0,63 L, 0,97 L e 0,22 L, no dia 1, de 0,44 L, 1,37 L, 1,03 L e 0,23 L, no dia 2, de 0,63 L, 0,63 L, 1,00 L e 0,61 L, no dia 3, para os grupos controlo e com as formulações contendo ácido láurico, cinnamaldeído e ambos, respetivamente. Através da análise estatística dos resultados dos animais com pesos

combinados entre os 14,00 e 16,50 kg, constatou-se uma ausência de discrepância nas ingestões de líquidos ao longo do tempo, para as formulações de ácido láurico ($p=0,614$), cinamaldeído ($p=0,963$) e ambos estes compostos ($p=0,989$), comparando com o grupo controle. Para além disso, comparando os valores da formulação com ácido láurico com os da com cinamaldeído ($p=0,842$) e ambos estes compostos ($p=0,766$) e comparando os valores destas duas últimas ($p=0,998$), também se verifica uma ausência de discrepância entre tratamentos. Esta igualdade de valores entre formulações e comparando estas com o grupo controle também foi verificada para os pesos combinados entre os 16,50 kg e 19,00 kg ($p>0,05$). Não foi possível a realização de análise estatística para as ingestões médias de líquidos diárias, considerando os animais com peso combinado, por parque, entre 19,00 kg e 21,50 kg, uma vez que, nestas condições, cada tratamento apresenta apenas um animal. No entanto, para estes animais, verifica-se uma tendência para maior ingestão da formulação de cinamaldeído e da de ácido láurico, comparativamente aos grupos controle e com a formulação contendo ambos estes compostos químicos, principalmente no dia 2 de estudo. Esta tendência mantém-se ao longo dos três dias de administração para a formulação de cinamaldeído, enquanto que no dia 3 de estudo já não se verifica para a formulação de ácido láurico (**figura 15**). Relativamente às ingestões médias de sólidos, não foi avaliada a influência dos pesos combinados no início do estudo em ambos os grupos, por ausência de ingestão de ração pelos animais. No entanto, para os leitões com pesos combinados por parque de 14,00 a 16,50 kg (**figura 16**), obtiveram-se valores de ingestão média de ração de 0,22 kg, 0,29 kg, 0,16 kg e 0,15 kg, no dia 2 e de 0,29 kg, 0,26 kg, 0,00 kg e 0,04 kg, no dia 3, para os grupos controle e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Por outro lado, para pesos combinados por parque de 16,50 kg até 19,00kg (**figura 17**), verificaram-se valores de 0,21 kg, 0,16 kg, 0,18 kg, 0,18 kg, no dia 2 e de 0,11 kg, 0,19 kg, 0,07 kg e 0,14 kg, no dia 3, para estes mesmos grupos nesta mesma ordem. Ainda, para pesos combinados entre 19,00 kg e 21,50 kg (**figura 18**), contataram-se valores de ingestões de líquidos de 0,14 kg, 0,21 kg, 0,17 kg e 0,14 kg, no dia 2 e de 0,00 kg, 0,07 kg, 0,00 kg e 0,00 kg, no dia 3, para os grupos controle e com as formulações contendo ácido láurico, cinamaldeído e ambos, respetivamente. Através da análise estatística dos resultados, para os animais com pesos combinados entre os 14,00 e 16,50 kg, constatou-se uma ausência de discrepância nas ingestões de líquidos ao longo do tempo, para as formulações de ácido láurico ($p=0,918$), comparando com o grupo controle. No entanto, já

foram verificadas alterações nas ingestões de sólidos ao longo do tempo, comparando as formulações de cinamaldeído ($p=0,010$) e ambos estes compostos ($p=0,010$), com o grupo controle. Para além disso, verificam-se ingestões médias de ração diferentes entre os tratamentos com a formulação com ácido láurico e os da com cinamaldeído ($p=0,007$) e ambos estes compostos ($p=0,009$), no entanto ausência de discrepância nos valores, entre estes dois últimos tratamentos ($p=0,976$). Analisando as ingestões de sólidos para os pesos combinados entre os 16,50 kg e 19,00 kg, verificou-se uma ausência de discrepância entre os resultados dos diferentes tratamentos e destes comparativamente aos do controle (todos os valores de $p>0,05$). Não foi possível a realização de análise estatística para as ingestões médias de sólidos diárias, considerando os animais com peso combinado, por parque, entre 19,00 kg e 21,50 kg, uma vez que, nestas condições, cada tratamento apresenta apenas um animal. No entanto, para estes animais, verifica-se também uma tendência para valores constantes destas ingestões, entre tratamentos e ao longo do tempo (**figura 18**). Assim, através da análise destes dados, constatou-se que as ingestões de líquidos não variam entre tratamentos ao longo do tempo, mesmo após a avaliação destes resultados por pesos combinados, por parque, dos leitões. No entanto, já se verificam discrepâncias nas ingestões de sólidos dos grupos das formulações de cinamaldeído e ambos os compostos, comparativamente aos grupos controle e formulação de ácido láurico, apenas para pesos combinados menores. Desta forma, demonstra-se que os pesos dos animais não influenciam as ingestões de líquidos, mas influenciam as ingestões de sólidos ao longo do tempo.

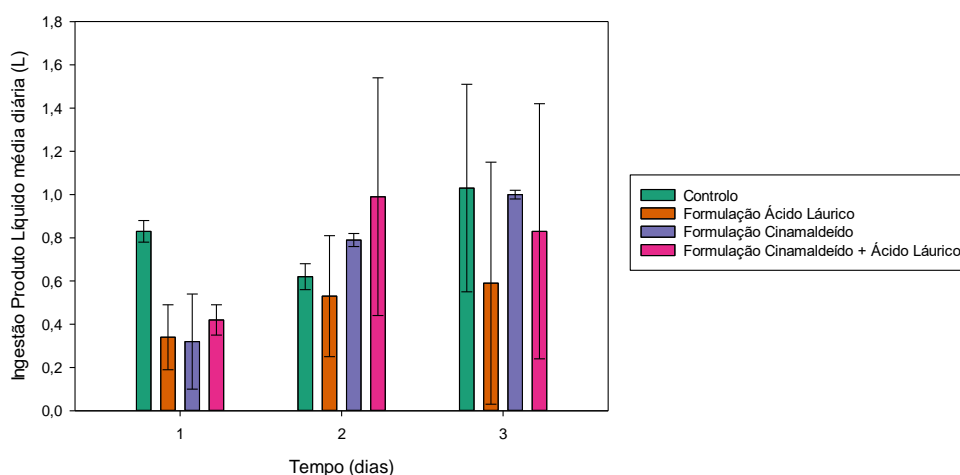


Figura 13 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controle e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 14,00 e 16,50 kg. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

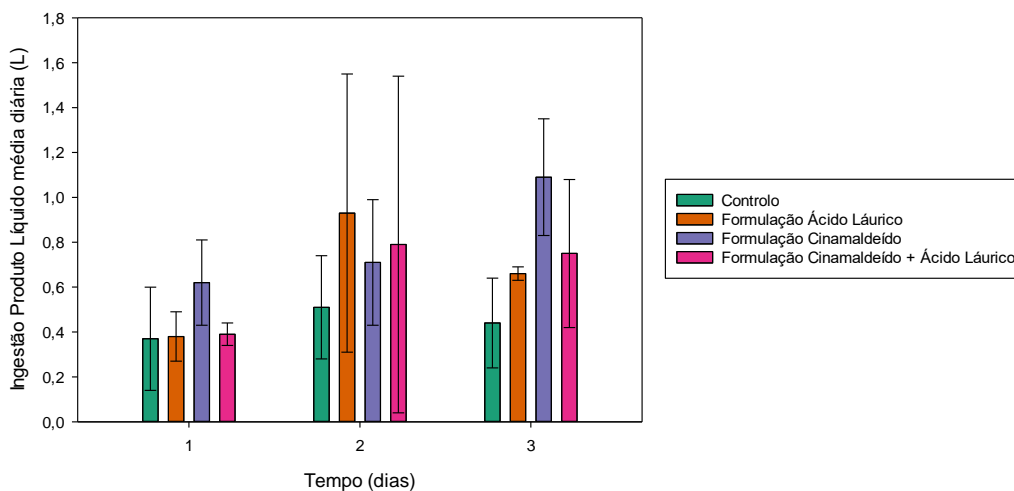


Figura 14 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 16,50 e 19,00 kg. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

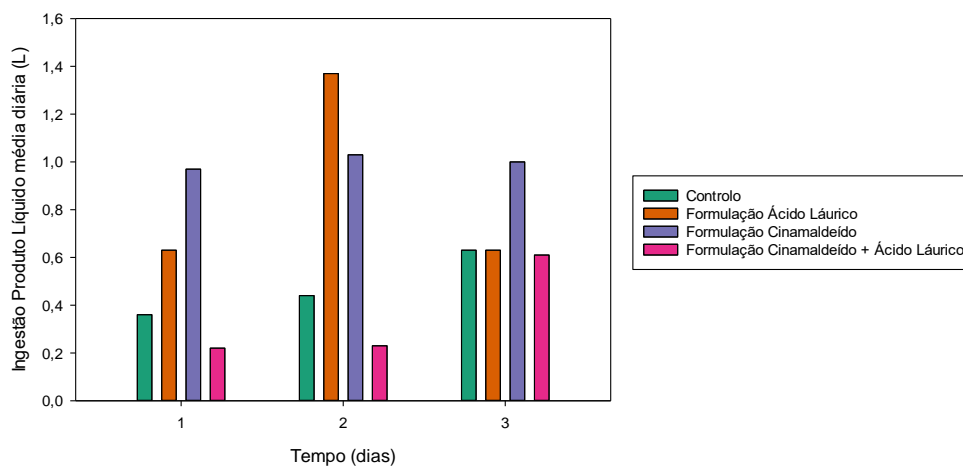


Figura 15 – Valores ingestão média diária de líquidos, em litros (L), para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 19,00 e 21,50 kg. Não foi realizada a análise estatística destes dados, uma vez que cada grupo, nestas condições, apresenta apenas um animal.

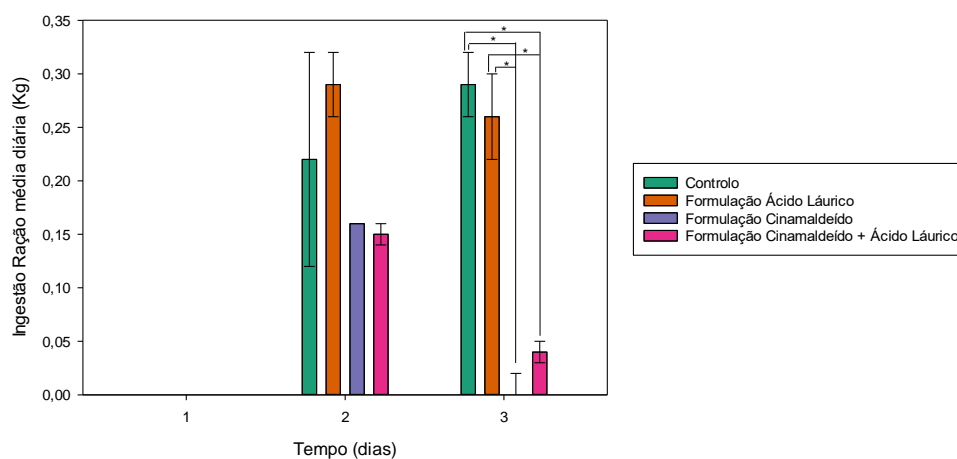


Figura 16 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 14,00 e 16,50 kg. * $p < 0,05$. Todos os restantes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

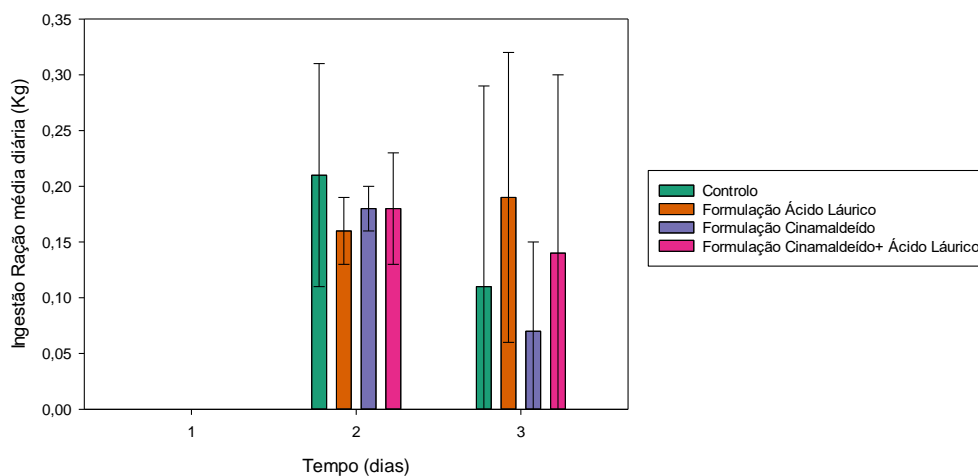


Figura 17 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinnamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 16,50 e 19,00 kg. Todos estes valores não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

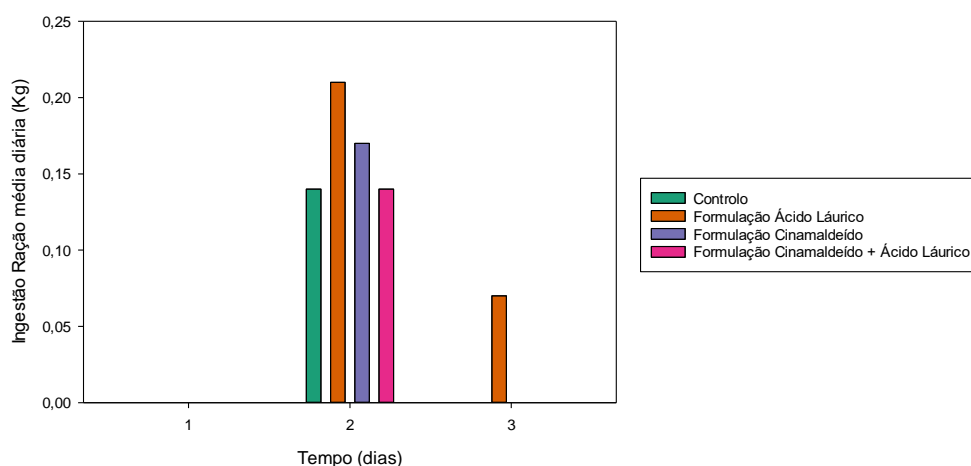


Figura 18 – Valores de ingestão média diária de ração sólida, em kg, para os diferentes grupos, controlo e com administração da formulação com cinamaldeído apenas, com apenas emulsão de óleo de coco ou com ambos, nos dias 1, 2 e 3 de estudo, considerando pesos combinados por parque, contendo dois animais do sexo oposto, compreendidos entre 19,00 e 21,50 kg. Não foi realizada a análise estatística destes dados, uma vez que cada grupo, nestas condições, apresenta apenas um animal.

A análise estatística das medidas das ingestões de líquidos e de ração e dos pesos dos animais, ao longo do tempo, também foi avaliada com os respetivos logaritmos de base 10 destes resultados. Esta análise foi realizada também, inicialmente, considerando os 48 animais e depois avaliando a influência do sexo, da idade e/ou dos pesos iniciais dos animais nestes parâmetros *in vivo*. Estes resultados não foram apresentados, uma vez que a análise estatística obtida foi semelhante à verificada para os resultados brutos, sem o logaritmo, anteriormente apresentados. Através da análise estatística destes resultados, verificou-se uma ausência de discrepância dos valores medidos destes parâmetros entre tratamentos ($p > 0,05$), exceto aquando da comparação do logaritmo das ingestões médias de ração no grupo controlo e com formulação de ácido láurico com os grupos das formulações de cinamaldeído e de ambos os compostos ($p < 0,05$), para animais com peso combinado entre 14,00 e 16,50 kg. Assim, verificou-se uma ausência de influência do sexo, da idade e/ou dos pesos iniciais dos animais nas ingestões de líquidos e nos pesos destes, ao longo do tempo. Para além disso, em ambas as análises estatísticas, obtiveram-se valores constantes entre tratamentos ao longo do tempo. Ainda, constatou-se a influência do peso inicial combinado dos animais, por parque, nas ingestões de ração sólida. Para os animais com pesos combinado mais baixos (14,00-16,50 kg), existe uma discrepância nas ingestões média de ração e nos logaritmos destas, ao longo do tempo, comparando os tratamentos com

cinamaldeído e ambos os compostos com os tratamentos controle e com o ácido láurico. Assim, verifica-se que esta análise estatística, do logaritmo de base 10 dos resultados obtidos *in vivo*, foi idêntica à descrita atrás sem logaritmo, tal como seria de esperar, uma vez que os resultados apresentam uma distribuição normal.

Concluindo, a avaliação da aceitabilidade destas três formulações do produto demonstrou uma ausência de discrepância na aceitabilidade destas formulações relativamente ao grupo controle e uma redução da incidência de DPD, ao longo do tempo. Esta ausência de discrepância entre grupos, demonstra que as três formulações desenvolvidas são tanto aceitáveis quanto a água, pelos animais. Esta eliminação preliminar da possibilidade da rejeição sensorial destas formulações é um resultado promissor, uma vez que estes são produtos ácidos. Para além disso, apesar das ingestões destas formulações terem sido em cerca de metade do esperado, e para as quais as formulações foram desenvolvidas, sugerindo a possível necessidade de reformulação, também foram igualmente baixas para o grupo controle. Os primeiros dias após o desmame são caracterizados por baixa ingestão de ração e líquidos e de reação dos animais, devido ao stress sentido por estes nesta fase do seu desenvolvimento. Desta forma, após a confirmação preliminar de ausência de rejeição destas formulações e baixa incidência de DPD, seria importante realizar estudos de maior duração, averiguando a possível existência de preferência entre formulações pelos animais, até 5 a 7 dias após o desmame. Nesta altura, espera-se um aumento de enzimas digestivas ativas e aumento no desenvolvimento do sistema imune animal, tornando-se mais autossuficientes.

3. Estudos de estabilidade

O produto deve ser passível de ingestão pelos leitões, mas também estável em termos físico-químicos e microbiológicos. Assim, foram realizados estudos no laboratório da D.I.N., no sentido de verificar se o produto mantém as suas características e é estável durante um mês. A avaliação da estabilidade das três formulações em estudo consistiu na determinação de diversos parâmetros, sob diferentes condições de armazenamento, incluindo diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 41,5 °C) e indução de hidrólise ácida (HCl 0,1M) e básica (NaOH 0,1M) e oxidação das formulações, com 3% H₂O₂. Os vários

parâmetros determinados em cada uma destas condições incluem a aparência da solução, o pH e o índice de peróxidos de cada formulação. Adicionalmente, avaliou-se a concentração de íons sódio, potássio e cloreto, de glucose e de ácido láurico e ainda, realizou-se a pesquisa de *Salmonella* e contagem de *E.coli*, *Enterobacteriaceae*, microrganismos totais, *Estafilococcus* e bolores e leveduras. Estes últimos são microrganismos com maior resistência a valores de pH mais baixos, tornando-se muito importante a sua contagem nas várias formulações, ao longo do tempo. Contrariamente a todas as outras determinações, a avaliação microbiológica foi apenas realizada na avaliação da influência da temperatura na estabilidade das formulações do produto e não nos estudos acelerados. Não foi apresentada a determinação do cinamaldeído, uma vez que se verificaram-se dificuldades na detecção deste composto nas amostras por GC-FID. Será necessário, posteriormente, desenvolver e testar um método de extração, possivelmente um processo de decantação, do cinamaldeído para estas amostras a diferentes temperaturas e contendo NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M e 3 % H₂O₂, de forma a avaliar a estabilidade deste composto, ao longo do tempo.

3.1. Estudo da estabilidade da formulação com cinamaldeído

A estabilidade da formulação contendo apenas cinamaldeído foi avaliada a diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 41,5 °C) e induzir hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M) e a sua oxidação (3% H₂O₂). Os parâmetros físico-químicos, incluindo a aparência, o pH, o índice de peróxidos, as concentrações dos vários componentes da mistura, e os parâmetros microbiológicos (*Salmonella*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, microrganismos totais, *Estafilococcus* e bolores e leveduras) foram avaliados após 1, 15 e 30 dias, desde que o produto foi sujeito às diferentes condições térmicas mencionadas anteriormente. Por outro lado, os estudos de estabilidade acelerados consistiram na determinação destes mesmos parâmetros, exceto a avaliação microbiológica, após 1 e 4 dias de exposição ao NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M e 3% H₂O₂. No caso dos íons Na⁺ e K⁺, realizou-se apenas a determinação destes parâmetros após 2 dias de exposição a NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M e 3% H₂O₂, dada a afluência de trabalho nesta semana no laboratório da D.I.N. Assim, torna-se possível avaliar a influência da temperatura e destas condições de stress na estabilidade dos diferentes constituintes da formulação com cinamaldeído apenas.

A avaliação da aparência de um produto é importante como característica física deste e também por poder demonstrar algumas alterações indesejáveis que possam ocorrer neste. Um exemplo disto, é a associação do aumento da turbidez com o desenvolvimento microbiológico no produto. A avaliação da aparência do produto apenas com cinamaldeído consistiu na determinação do espectro da absorvância da amostra na região do visível, entre 380-720 nm, através do espectrofotômetro UV/Visível, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Através da análise dos espectros obtidos, verificou-se uma tendência para a sobreposição dos espectros desta formulação a diferentes temperaturas e a manutenção desta sobreposição ao longo do tempo. Desta forma, demonstra-se a ausência de influência da temperatura, à qual a formulação está sujeita, na aparência desta, durante um mês (**figura 19**). Isto poderá também induzir a ideia de ausência de desenvolvimento microbiológico, que promoveria o aumento da turbidez do produto e alteração nos valores de absorvância. Esta avaliação microbiológica será discutida mais à frente. Assim, mesmo que esta formulação seja sujeita a elevadas temperaturas, até aos 41.5°C, aquando do seu armazenamento e transporte, manter-se-á estável, em termos da sua aparência.

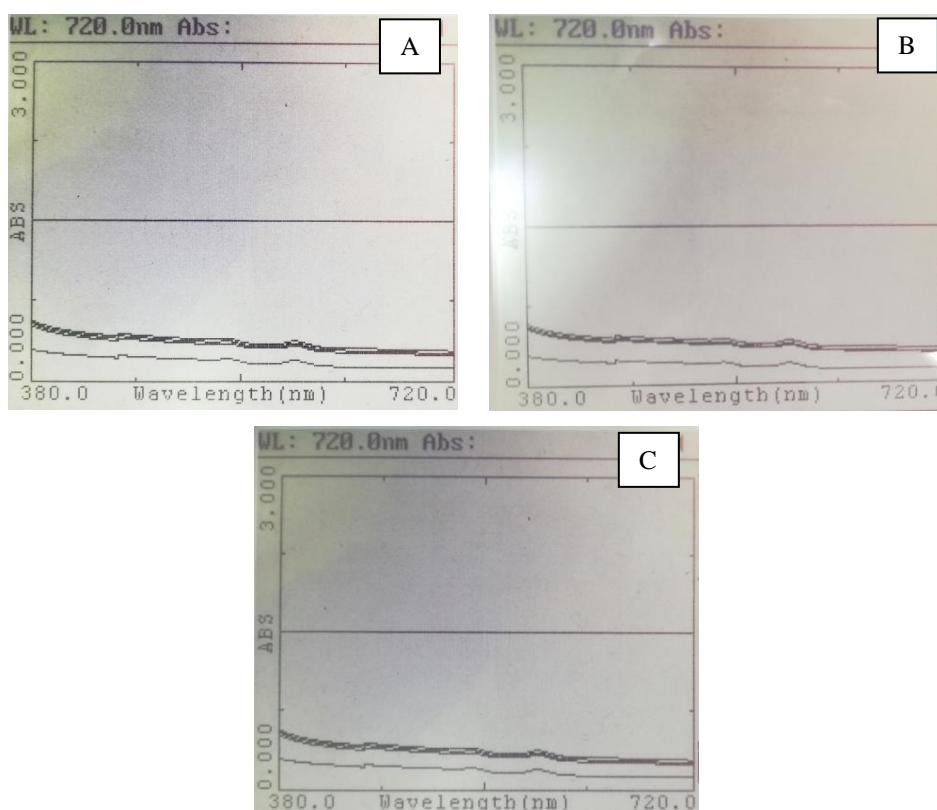
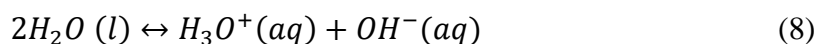


Figura 19 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro UV/Visível, nos dias 1 (A), 15 (B) e 30 (C) de estudo a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, e da água destilada.

O pH é um parâmetro importante a determinar pois caracteriza o produto em termos químicos, refletindo possíveis alterações que possam estar a ocorrer, que promovam a libertação de prótons H^+ para a solução. Para além disto, o pH vai influenciar o desenvolvimento microbiológico no produto. No início do estudo obteve-se um valor de pH de 4,56 para a formulação sujeita tanto a 5 °C, como a 25 °C e 41,5 °C (**figura 20**). A meio do mês, no dia 15, verificou-se valores de pH de 4,60, 4,52 e 4,48 para a formulação de cinamaldeído a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente. Ao final de um mês de estudo, constatou-se valores de pH de 4,58, 4,50 e 4,47, para a formulação de cinamaldeído a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente. Através da análise destes dados, verificou-se uma tendência para a diminuição do valor de pH ao longo do tempo. Nos dias 15 e 30 de estudo, existe uma pequena tendência para a redução do valor de pH da formulação sujeita a 41,5 °C e aumento para a formulação sujeita a 5 °C. Apesar da medição do pH ter sido uma das últimas determinações a ser realizada, mantendo as amostras das formulações à temperatura ambiente, não foi garantida a homogeneidade desta temperatura entre as várias condições, aquando da medição, recorrendo a um termómetro. A possível ausência de uniformidade de temperatura nas várias formulações, aquando da medição do pH, poderá explicar esta tendência para a variação do valor de pH em função da temperatura de medição da formulação. Segundo o princípio de Le Chatelier, induzem-se alterações no sistema no sentido de diminuição da temperatura da formulação a 41,5 °C, absorvendo a energia do meio exterior e favorecendo a formação de iões H_3O^+ e OH^- , segundo a **reação 8**, e o inverso para a formulação a 5 °C. Assim, verifica-se que a formulação do produto desenvolvido contendo apenas cinamaldeído, mesma quando sujeita a temperaturas elevadas, tem tendência a não sofrer alterações químicas que se reflitam na variação da concentração de iões H^+ em solução, ao longo de um mês. Neste estudo, verificou-se uma tendência para a variação do pH em função da temperatura de medição das formulações, mas não em função da temperatura de conservação.



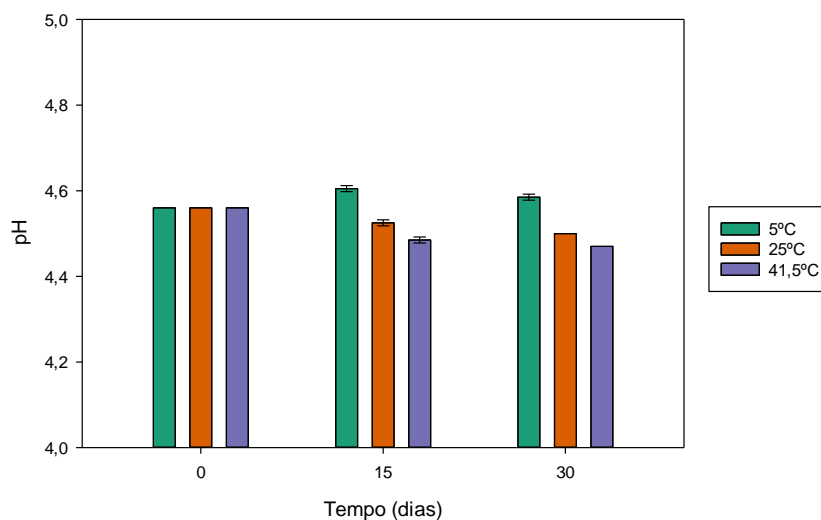


Figura 20- Valores de pH, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

O índice de peróxidos é uma medida que avalia o grau de oxidação de um produto. A determinação do índice de peróxidos da formulação, contendo cinamaldeído, do produto desenvolvido, permite avaliar se as diferentes condições em estudo influenciam a estabilidade oxidativa desta. No início do estudo, verificaram-se valores de índice de peróxido de 0,06 miliequivalentes de oxigênio ativo (meq O₂) para a formulação sujeita às várias temperaturas. Por outro lado, no dia 15, obtiveram-se valores de 0,06 meq O₂ para as formulações a 5°C e 25°C e 0,08 meq O₂ para a formulação de cinamaldeído a 41.5°C. Ao final de um mês, os valores de índice de peróxidos foram de 0,08 meq O₂, 0,09 meq O₂ e 0,13 meq O₂ para as formulações de cinamaldeído a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respectivamente (**figura 21**). Através da análise destes dados, verifica-se uma tendência para valores constantes do índice de peróxidos entre as formulações de cinamaldeído a diferentes temperaturas, tanto nos dias 1, 15 e 30 de estudo. É possível constatar-se uma tendência para a conservação de cada formulação de cinamaldeído a diferentes temperaturas, em termos de oxidação, ao longo do tempo. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que esta formulação não contém lípidos, não estando propícia a oxidação, com contribuição para o aumento do índice de peróxidos da amostra ao longo do tempo. Assim, verifica-se que a formulação de cinamaldeído demonstra ser estável em termos oxidativos durante um mês, mesmo a temperaturas elevadas, apresentando resultados de índice de peróxidos abaixo de

10 meq O₂, necessários para a garantia da segurança e qualidade alimentar de qualquer produto¹⁶³.

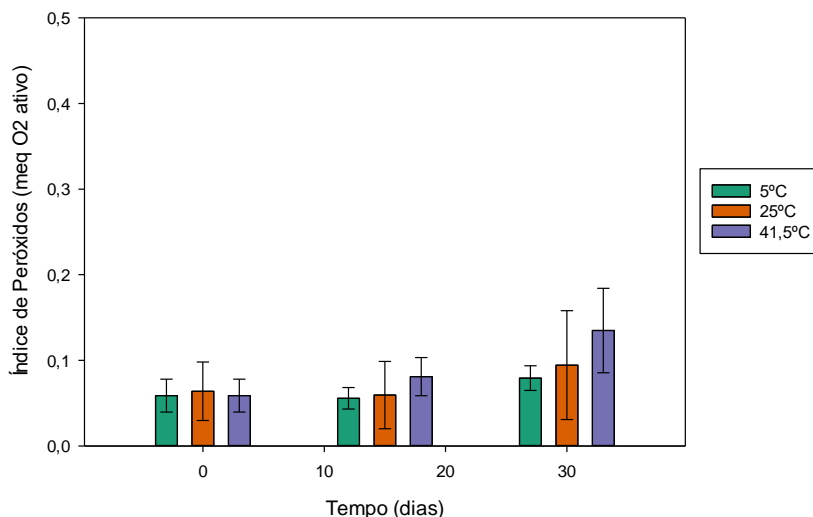


Figura 21- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A avaliação da estabilidade de uma formulação carece da quantificação dos seus constituintes, para além dos parâmetros referidos anteriormente. Assim sendo, foi realizada a quantificação dos iões Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em solução na formulação de cinamaldeído sujeita a diferentes temperaturas. A quantificação dos iões Na⁺ e K⁺ foi determinada através da substituição dos resultados de absorvância medidos, nas curvas de calibração de Na⁺ e K⁺, obtidas a partir de soluções padrão destes iões (**anexo 3 e 4**). No início do estudo, as concentrações de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ foram de 1,26 g/L, 0,14 g/L e 2,86 g/L, respetivamente, para as várias temperaturas às quais a formulação de cinamaldeído foi submetida. No dia 15, as concentrações de Na⁺ obtidas para a formulação de cinamaldeído a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C foram de 1,23 g/L, 1,27 g/L e 1,21 g/L, respetivamente (**figura 22A**). Por outro lado, as concentrações de K⁺ a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C foram de 0,14 g/L, 0,14 g/L e 0,15 g/L, respetivamente, e de Cl⁻ foram de 3,21 g/L, 2,88 g/L e 3,19 g/L, respetivamente (**figura 22B e 22C**), para estas condições. Por fim, no dia 30 de estudo, verificaram-se concentrações de Na⁺ na formulação de cinamaldeído a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C de 1,22 g/L, 1,20 g/L e 1,24 g/L, respetivamente. No entanto, as concentrações de K⁺ foram de 0,14 g/L para as várias temperaturas estudadas e as concentrações de Cl⁻ a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C foram de 2,81 g/L,

3,17 g/L e 3,60 g/L, respectivamente. Através da análise destes resultados, verifica-se uma tendência para a manutenção constante destas concentrações nos dias 1, 15 e 30 de estudos. Para além disso, para cada uma destas condições às quais a formulação foi submetida, existe uma tendência para igualdade de concentrações dos iões Na^+ , K^+ e Cl^- ao longo do tempo. Comparando estes resultados com os valores teóricos esperados, de 1,03 g/L, 0,16 g/L e 2,86 g/L para as concentrações de iões Na^+ , K^+ e Cl^- , respectivamente, constata-se que os valores obtidos correspondem aos esperados, que foram adicionados aquando da produção desta formulação. Assim, através deste estudo pode-se concluir que mesmo que a formulação de cinamaldeído seja sujeita a diferentes temperaturas, durante o seu armazenamento, até aos 41,5 °C, estas não irão afetar o teor de sais em solução ao fim de um mês, garantindo-se assim a estabilidade dos iões em solução durante este tempo de armazenamento.

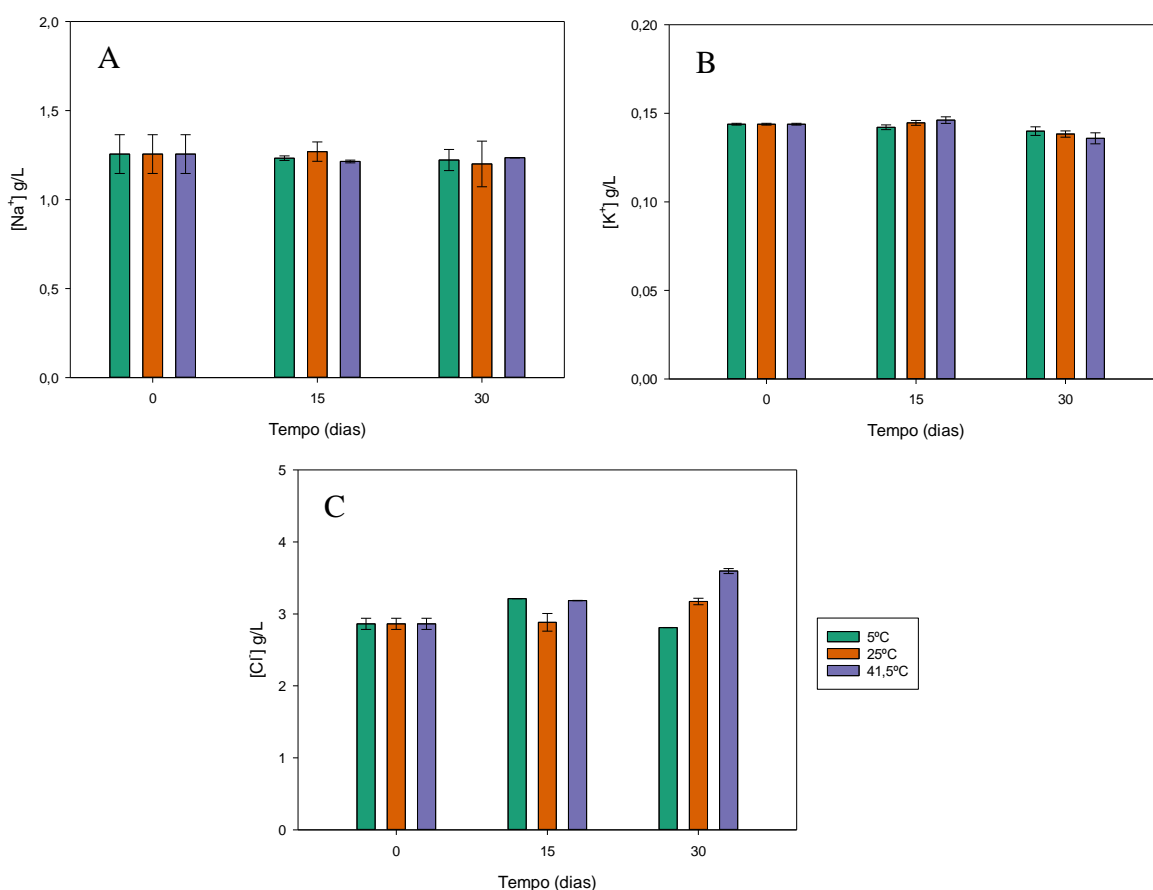


Figura 22- Valores da concentração de iões Na^+ (A), K^+ (B) e Cl^- (C), da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

O produto desenvolvido apresenta glucose em elevadas concentrações, de forma a garantir o fornecimento energético diário necessário aos leitões após o desmame, quando as ingestões de alimento são muito reduzidas, tal como se verificou nos estudos in vivo. Assim, para além dos iões presentes em solução, também é importante avaliar a estabilidade da glucose em solução, ao longo do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento a que o produto possa ser sujeito. As concentrações de glucose foram determinadas através da substituição das áreas dos picos obtidos nas amostras, ao tempo de retenção típico da glucose, na curva de calibração de glucose, obtida para soluções padrão de 0,25 %, 0,5 % e 1 % de glucose (**anexo 5 e 6**). No início de estudo, obteve-se uma concentração de glucose de 52,0 g/L para as várias temperaturas estudadas. Por outro lado, no dia 15 de estudo, verificaram-se concentrações de glucose de 51,8 g/L, 51,2 g/L e 52,4 g/L, para a formulação de cinamaldeído a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 23**). Por ausência de confiança nos resultados obtidos no dia 30 de estudo, por mau funcionamento do HPLC, estas concentrações não foram apresentadas. Os cromatogramas obtidos, por HPLC, para estas amostras podem ser consultados no **anexo 7**. Através da análise destes resultados, constatou-se uma tendência para valores constantes de glucose, comparando as diferentes condições de temperatura nos dias 1 e 15 de estudo, como também comparando condição a condição ao longo do tempo até aos 15 dias. Comparando estes resultados com o valor esperado, verificam-se concentrações semelhantes às adicionadas em solução, de 50,0 g/L, e uma ausência de degradação desta ao longo do tempo. Apesar da oxidação da glucose em contacto com o ar ser uma reação espontânea (ΔG negativo), não ocorre a taxas perceptíveis na ausência de enzimas ou a temperaturas abaixo dos 100 °C.^{164,165} Apenas o possível desenvolvimento microbiológico em solução é que poderia justificar uma possível diminuição desta. Desta forma, dados os resultados, espera-se uma ausência deste durante 15 dias, tal como será constatado mais à frente. Assim, tendo em conta todos estes aspetos, pode-se concluir que a glucose é estável ao longo de 15 dias de estudo, mesmo quando esta formulação é sujeita a temperaturas elevadas, até aos 41,5 °C, aquando do seu transporte e armazenamento.

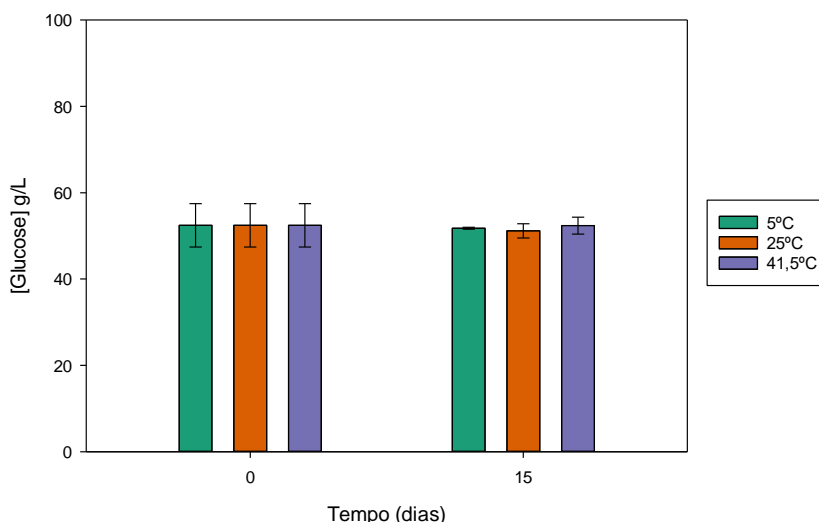


Figura 23- Valores da concentração de glucose, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 e 15 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A avaliação da estabilidade da formulação de cinamaldeído também inclui a avaliação do perfil lipídico da formulação a diferentes temperaturas, apesar desta formulação não apresentar gordura, por ausência da emulsão de óleo de coco. Esta determinação permitirá avaliar a possível contaminação de gordura entre formulações quando da sua produção no misturador de líquidos. Através da análise dos cromatogramas obtidos por GC-FID, verifica-se que a formulação de cinamaldeído a 5 °C apresenta ácido láurico na sua constituição, mas em pequenas quantidades, de 0,03 g/L, enquanto que as formulações a 25 °C e 41,5 °C não apresentam quaisquer lípidos na sua composição (**anexo 9**). Assim, pode-se constatar que esta formulação não apresenta este composto, tal como esperado, e que não existe contaminação desta durante a produção das três formulações, no misturador de líquidos.

Por fim, a avaliação da estabilidade de um produto consiste na sua avaliação química, mas também na sua avaliação microbiológica. Através desta avaliação da formulação de cinamaldeído (**tabela 6**), obtiveram-se resultados negativos para todos os microrganismos testados, para as diferentes temperaturas às quais a formulação de cinamaldeído foi sujeita e ao longo do tempo. Estes resultados já tinham sido previstos por ausência de alteração das concentrações de glucose em solução, ao longo do tempo. Assim, a formulação de cinamaldeído é segura em termos microbiológicos durante um mês, mesmo quando sujeita a temperaturas elevadas até aos 41,5 °C, durante o seu armazenamento.

Tabela 6- Valores de pesquisa de *Salmonella* e contagem de microrganismos totais, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Bolores, leveduras e *Estafilococcus* da formulação contendo apenas cinamaldeído, nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Microrganismos	Temperatura (°C)/tempo (dias)	0	15	30
Microrganismos totais	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>E. coli</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Salmonella</i>	5 °C	Ausente	Ausente	Ausente
	25 °C	Ausente	Ausente	Ausente
	41 °C	Ausente	Ausente	Ausente
Bolores	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
Leveduras	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Estafilococcus</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0

O estudo da estabilidade de qualquer produto, quer seja com um objetivo nutricional, quer seja com um objetivo terapêutico, terá de incluir estudos acelerados, induzindo a degradação deste. Desta forma, é possível avaliar que compostos se possam formar nessas condições e como é os parâmetros anteriormente medidos, principalmente dos constituintes do produto, variam com estas condições de stress. No estudo acelerado da formulação de cinamaldeído realizou-se a determinação do pH, garantindo um pH ácido, aquando da adição do HCl 0,1 M ao produto, um pH básico, aquando da adição de NaOH 0,1 M ao produto. No dia 1 de estudo, os valores de pH tenderam a variar de 4,49, correspondente à formulação de cinamaldeído original, para 10,77 e 1,49, na solução da formulação de cinamaldeído com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, respetivamente (**figura 24**). Por outro lado, o valor do pH

verificado para a condição de indução de oxidação, de 4.46, tendeu para se manter constante no dia 1 de estudo. Relativamente ao dia 4, obtiveram-se valores de pH de 10,54, 1,44 e 3,89 para as formulações de cinamaldeído sujeitas a NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M e 3% H₂O₂, respetivamente. Após a análise destes resultados, verificou-se uma tendência para a redução do pH, após a adição de HCl 0,1 M, tal como esperado, e uma tendência para o aumento do pH, após a adição de NaOH 0,1 M e estas tendências mantiveram-se ao longo do tempo. Assim, confirma-se que a preparação destas condições promoverá a possível degradação do produto, em meio básico e ácido, e que estas condições são mantidas ao longo do tempo do estudo, durante o qual serão monitorizados vários parâmetros físico-químicos do produto.

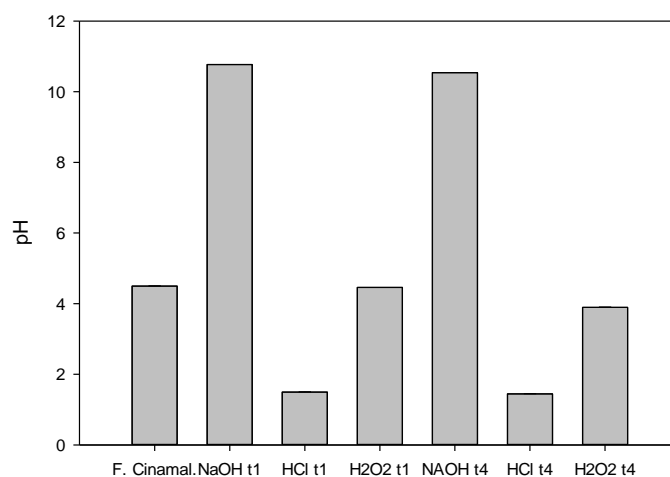


Figura 24- Valores de pH, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3% H₂O₂).

No estudo acelerado é necessária a monitorização dos parâmetros físico-químicos do produto ao longo do tempo, tendo estes no máximo a duração de 5 a 7 dias. Neste estudo avaliou-se a influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da formulação de cinamaldeído, após 1 e 4 dias, na aparência do produto, no índice de peróxidos, exceto para a condição de oxidação, em que esta é evidente, e na concentração dos diversos constituintes do produto, incluindo iões Na⁺, K⁺ e Cl⁻ e glucose. Na avaliação da aparência, obtiveram-se espectros da absorvância na zona do visível das várias condições em estudo coincidentes, no dia 1 e no dia 4 do estudo, tal como aconteceu no estudo da formulação a diferentes temperaturas e na formulação original de cinamaldeído (**figura 25**). Desta forma, constata-se que uma possível oxidação ou indução de hidrólise ácida e básica não se reflete em alterações na aparência do produto, que pudessem ser indesejáveis. Relativamente ao índice

de peróxidos, obteve-se um índice de peróxidos de 0,11 meq de O₂ ativo para a formulação de cinamaldeído original, a partir da qual se preparou as soluções com NaOH e HCl. A formulação de cinamaldeído sujeita a NaOH 0,1 M apresenta valores de índice de peróxidos de 0,18 e 0,12 meq O₂, nos dias 1 e 4 de estudos, respetivamente. No entanto, o índice de peróxidos da formulação de cinamaldeído sujeita a HCl 0,1 M é de 0,00 e 0,01 meq O₂, nos dias 1 e 4 de estudo, respetivamente (**figura 26**). Através da análise destes dados, verificou-se uma tendência para a valores constantes deste parâmetro, comparando os resultados da formulação de cinamaldeído original e da formulação sujeita a NaOH (0,1 M) em ambos os dias de estudo, e também em cada uma destas ao longo do tempo. No entanto, os resultados demonstram uma tendência para a redução do índice de peróxidos da formulação sujeita a HCl (0,1 M), nos dias 1 e 4, comparativamente à formulação de cinamaldeído original e a formulação de cinamaldeído sujeita a NaOH (0,1 M). Ainda, estes resultados com hidrólise ácida tendem a manter-se constantes ao longo do tempo. Assim, comparando as diferentes condições em estudo, constatou-se uma influência do pH na oxidação desta formulação, com aumento do índice de peróxidos associado a um aumento de pH. Em meio ácido, na presença de 0,1 M de HCl, poderá existir um aumento da solubilidade do Fe²⁺ em solução (**equação 9**), que contribuirá para a oxidação do produto e aumento do índice de peróxidos.¹⁶⁶ No entanto, a descrição na literatura do efeito do pH na oxidação lipídica é contraditória. Na literatura existem diversas referências que demonstram um aumento do índice de peróxidos associado ao aumento do pH, mesmo para o estudo da estabilidade de emulsões de gordura.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Isto é explicado pelos autores como uma consequência da diminuição da solubilidade do Fe²⁺ e a sua precipitação, na forma de FeCl₂ (**equação 9**), podendo entrar em contacto com os compostos e promover a sua oxidação. Para além disso, poderá existir uma reação do ferro com os iões OH⁻ do NaOH e promover o aumento de Fe²⁺ (**reação 10**). Este Fe²⁺ poderá contribuir para o aumento da oxidação do produto. Assim, verifica-se que o índice de peróxidos é fortemente influenciado pelo pH, no entanto existe uma controvérsia nos resultados descritos na literatura. Nas condições deste estudo, verifica-se uma tendência para a indução da oxidação da formulação de cinamaldeído, quando sujeita a NaOH 0,1 M, e redução da oxidação da formulação, na presença de HCl 0,1 M. Caso este processo se venha a manifestar problemático, poderá ser ultrapassado pela adição extra à formulação de um agente quelante, como por exemplo, o EDTA.

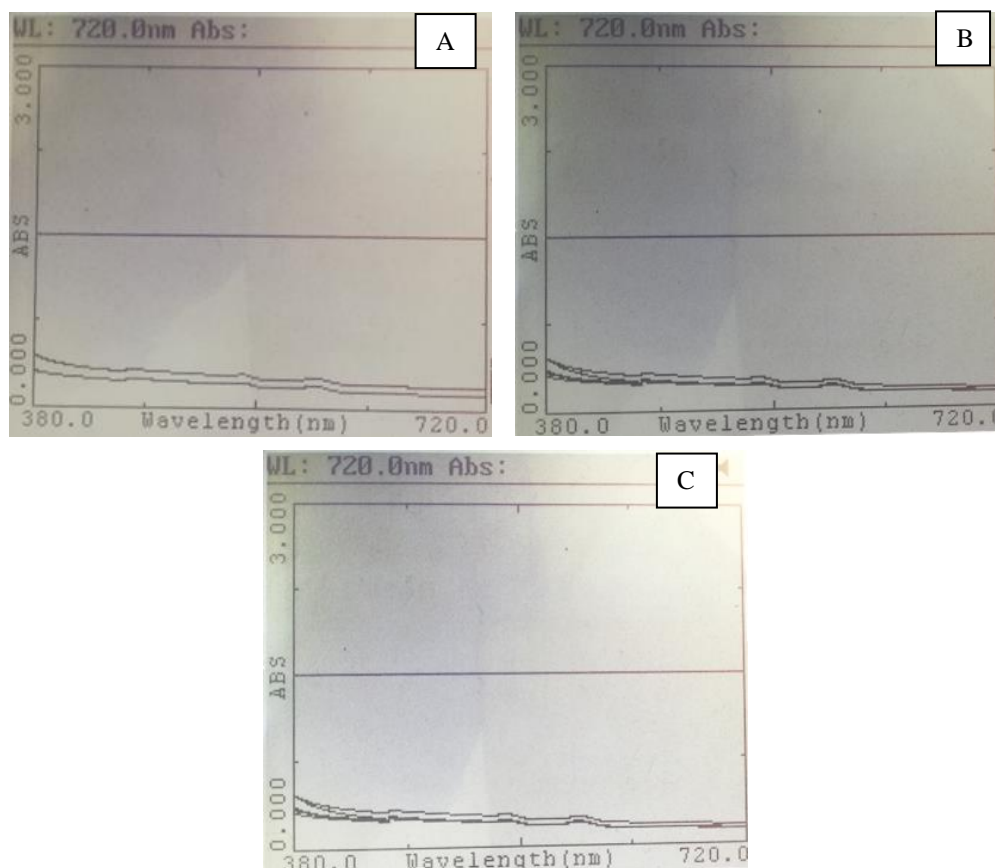
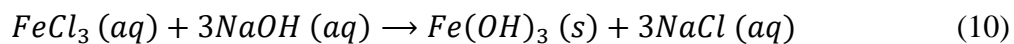
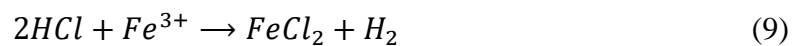


Figura 25 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação de cinamaldeído original (A) e desta formulação em meio ácido (HCl 0,1 M), meio básico (NaOH 0,1 M) e sob oxidação (3% H₂O₂), obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (B) e 4 (C) de estudo.

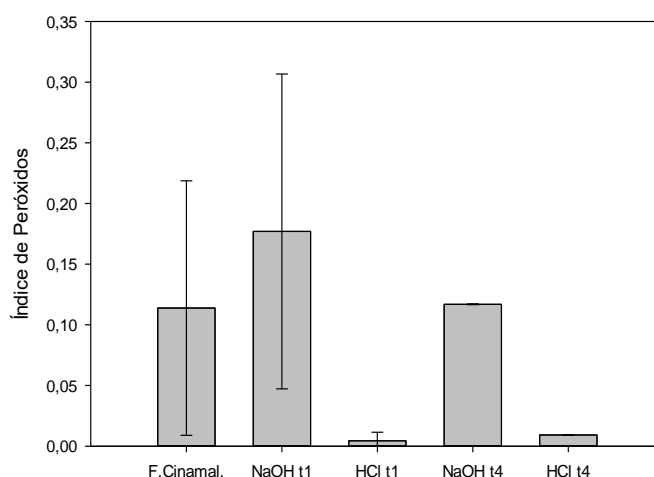


Figura 26- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M).

A concentração dos constituintes da formulação de cinamaldeído pode ser afetada após hidrólise ácida e básica e oxidação desta. Assim, monitorizaram-se estes parâmetros ao longo do tempo em cada uma das condições, exceto para o Na^+ e o K^+ , com determinação apenas no dia 2 de estudo. Tanto as concentrações de Na^+ e de K^+ foram determinadas após a determinação de uma curva de calibração dos valores de absorvância em função da concentração destes íons, obtida a partir das soluções padrões. Estas curvas de calibração são apresentadas nos **anexos 10 e 11**. Relativamente às concentrações de Na^+ , a formulação de cinamaldeído original apresenta uma concentração de Na^+ medida de 1,25 g/L, enquanto que as formulações com NaOH, HCl e H_2O_2 apresentam 13,23 g/L, 1,78 g/L e 1,92 g/L, respetivamente, no dia 2 de estudo (**figura 27A**). Estas concentrações têm tendência para ser superiores ao esperado em termos teóricos, de 1,03 g/L, 1,35 g/L, 0,77 g/L e 0,52 g/L para as formulações de cinamaldeído original e sujeita a NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente. Este aumento na concentração de Na^+ poderá se dever a contaminações a partir do material de vidro, mesmo após lavagem deste em ácido nítrico diluído.¹⁷⁰ Relativamente aos íons de K^+ , verificaram-se concentrações deste íão de 0,14 g/L, 0,11 g/L, 0,07 g/L e 0,07 g/L, para as formulações de cinamaldeído original, com NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente, no dia 2 de estudo (**figura 27B**). Estes resultados têm tendência para estar próximos dos teóricos esperados, exceto para a formulação sujeita a HCl 0,1 M. Teoricamente, teríamos uma concentração de 0,16g/L, 0,12 g/L, 0,12 g/L e 0,08 g/L nas formulações original, com NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente. Esta tendência para a redução da concentração de K^+ na

presença de HCl, deve-se possivelmente à promoção, por este ácido forte, da precipitação de íons de K^+ na forma de KCl em solução, segundo o Princípio de Le Chatelier. Por fim, as concentrações de cloretos em solução obtidas na formulação de cinamaldeído original foram de 2,31 g/L. As concentrações deste íão foram de 1,10 g/L, 3,48 g/L e 0,58 g/L no dia 1 de estudo e 1,13 g/L, 3,30 g/L e 3,11 g/L no dia 4 de estudo, para as formulações de cinamaldeído sujeitas a NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente (**figura 27C**). Estes resultados estão de acordo com os valores teóricos esperados, exceto para a condição de NaOH e H_2O_2 . As concentrações de cloretos esperadas seriam de 2,85 g/L, 2,34 g/L, 3,60 g/L e 1,43 g/L para as formulações de cinamaldeído original, com NaOH, HCl e H_2O_2 . Estas tendências não são expectáveis, uma vez que a solubilidade dos sais de NaCl, que se possam formar em solução, é elevada, e que o H_2O_2 não reage de forma a perturbar a estabilidade dos íons em solução. Assim, é possível verificar a influência do NaOH, HCl e H_2O_2 na estabilidade dos íons em solução. Após a adição de HCl, verifica-se uma menor concentração de K^+ , tal como esperado, devido à precipitação destes íons na forma de KCl. As reduções em solução de cloretos na presença de NaOH e H_2O_2 , não são expectáveis, e o aumento de Na^+ em solução poderá dever-se a contaminações provenientes do material de vidro utilizado. No entanto, estas variações são menores, não sendo expectável que modifiquem a eficácia da formulação de cinamaldeído com o decorrer do tempo de prateleira deste produto.

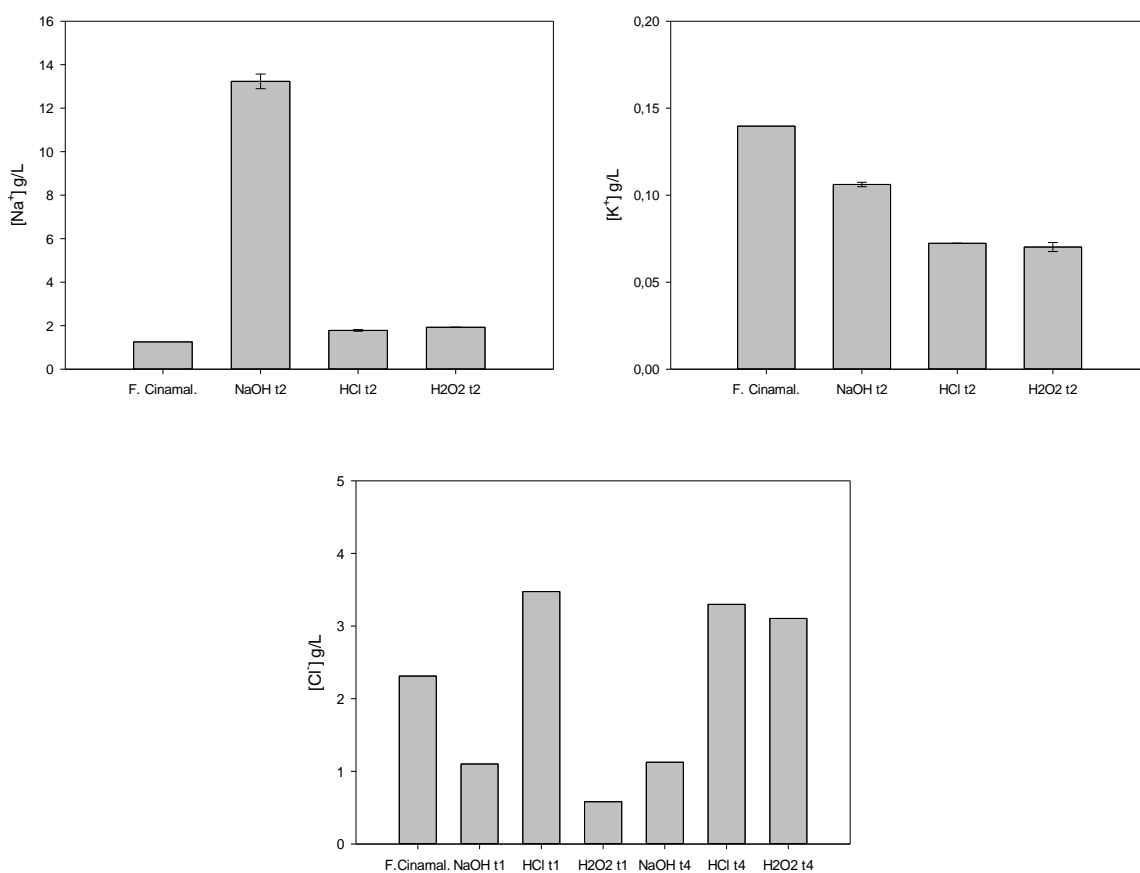


Figura 27- Valores da concentração de íons Na⁺ (A) e K⁺ (B) e obtidos no dia 2 de estudo, e de Cl⁻ (C), obtidos nos dias 1 e 4 de estudo, da formulação contendo apenas cinamaldeído, após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3% H₂O₂).

A estabilidade da glucose também foi avaliada nestes estudos acelerados da formulação de cinamaldeído. Através da análise dos cromatogramas obtidos por HPLC, apresentados no **anexo 5**, obteve-se uma concentração de glucose de 37,54 g/L na formulação de cinamaldeído original e constatou-se a ausência de glucose, pico característico ao tempo de retenção de 3,4 minutos obtido no padrão de 1 % de glucose, com a indução de hidrólise ácida, básica e oxidação. Na presença de H₂O₂, verifica-se o aparecimento de um pico ao tempo de retenção de 5 minutos e ausência aos 3,4 minutos, tanto no dia 1 de estudo como no dia 4 de estudo. Na presença de HCl, verifica-se algo semelhante ao obtido na indução de oxidação da amostra, com a ausência de qualquer pico aos 3,4 minutos e aparecimento de um pico aos 5 minutos de retenção, tanto no dia 1 como no dia 4 de estudo. Por fim, com a indução de hidrólise básica da formulação de

cinamaldeído, verifica-se a ausência de pico de glucose a 3.4 minutos de retenção, mas o aparecimento típico de um pico aos 4 minutos de retenção e outro pico aos 5 minutos de retenção, tanto no dia 1 como no dia 4 de estudo (**figura 28**). Através da comparação destes picos com os picos do cromatograma obtido após injeção de uma solução de 1 % de glucose, frutose e sacarose (**anexo 12**), foi possível identificar um pico a tempos de retenção semelhantes parecidos ao da sacarose, aos 5 minutos. Isto poderá criar a hipótese de presença de sacarose nas amostras, devido à ocorrência de reações de transformação da glucose nestas condições de stress. No entanto, esta é apenas uma hipótese, não sendo possível ter a certeza absoluta da presença de sacarose em solução, apenas pela análise dos tempos de retenção do composto. A glucose pode sofrer vários tipos de alterações em solução. Esta pode ser convertida em frutose, por isomerização, em ambas as condições ácidas e básicas (**figura 29**). Para além disso, em meio ácido, principalmente, pode ocorrer a dimerização dos monómeros de frutose e glucose, podendo originar a sacarose. Por último, por epimerização, esta pode ser convertida em D-manose, enquanto que a oxidação da glucose, com o O₂, obtido a partir do H₂O₂, pode promover a sua conversão a ácido D-glucónico (**figura 30**)¹⁷¹. Assim, é possível que, em ambas as condições de stress, esta sofra degradação e seja convertida noutros compostos. Ao aumentar o peso molecular dos produtos de degradação da glucose, comparativamente ao peso desta última, espera-se um aparecimento destes a tempos retenção superiores ao da glucose, neste caso de 3,4 minutos. Concluindo, a glucose é suscetível tanto a hidrólise ácida, como básica, como à oxidação com peróxido de hidrogénio, nas condições estudadas neste estudo de estabilidade acelerado.

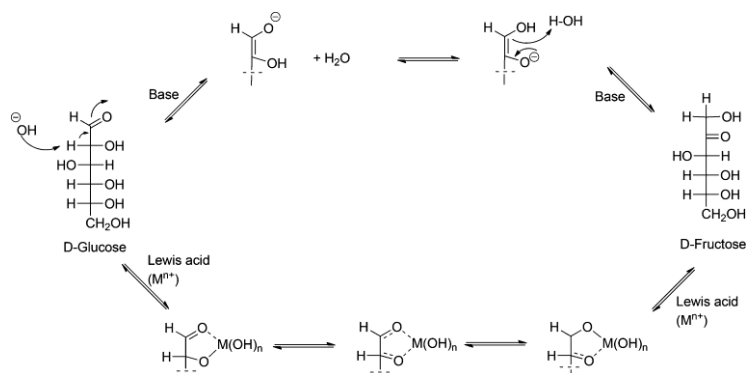


Figura 29 – Isomerização da D-glucose a D-frutose, em meio ácido e básico ¹⁷¹.

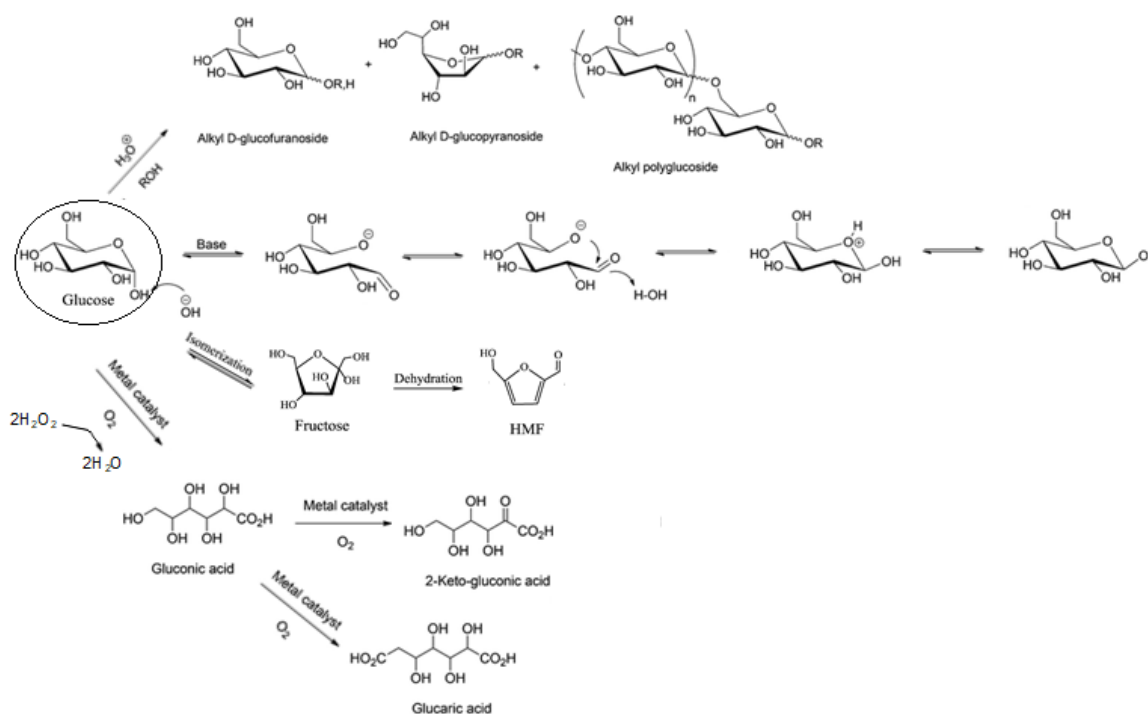


Figura 30- Degradação da D-glucose em meio ácido e básico por glicosilação, epimerização a D-manose e isomerização a D-frutose e oxidação a ácido D-glucónico. Adaptado de ¹⁷¹.

Por fim, avaliou-se também o perfil lipídico das formulações de cinamaldeído sujeitas a NaOH, HCl e H₂O₂, apesar de estas teoricamente não apresentarem gordura na sua constituição, como provado no estudo a diferentes temperaturas. A quantificação do ácido láurico foi realizado através da curva de calibração, apresentada no **anexo 8**, já predefinida no método utilizado no GC-FID da D.I.N. Através da análise dos cromatogramas (**figura 31**), obtidos após injeção das amostras esterificadas no GC-FID, verificou-se uma ausência de ácido láurico, pico característico ao tempo de retenção de 6,8 minutos, tanto na formulação de cinamaldeído original, como também, nas formulações sujeitas a HCl, NaOH

e H₂O₂, tal como esperado, em ambos os dias de estudo. No entanto, verificaram-se picos aos tempos de retenção de 12 e 16 minutos, apenas para a formulação sujeita a NaOH e HCl e apenas no dia 1 de estudo, não aparecendo no quarto dia. Estes resultados demonstram que existe alguma alteração química na formulação, mesmo que não de gordura, ausente nesta formulação. No entanto, não é possível perceber quais os compostos formados ou vias de degradação. Seria interessante a repetição destas determinações em GC-MS, tornando-se possível avaliar as vias e os compostos de degradação. Para além disso, mesmo que existisse gordura na sua composição, os ácidos orgânicos, da mistura ácida, e os ácidos gordos do óleo de coco, são ácidos carboxílicos e, como tal, são geralmente mais resistentes a degradação. Assim, verifica-se uma ausência de ácido láurico, tal como seria de esperar, e uma influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação da amostra na estabilidade da formulação de cinamaldeído.

Concluindo, a formulação de cinamaldeído demonstra ser estável durante um mês, uma vez que as concentrações dos seus constituintes, iões e glucose, se mantêm constantes. Para além disso, não há alterações na sua aparência e no valor de pH ao longo do tempo e não se verifica desenvolvimento microbiológico. Por fim, a avaliação do grau de oxidação do produto, garantiu uma ausência desta ao longo do tempo. Estes resultados tenderam a ser semelhantes tanto para a temperatura ambiente como também para temperaturas mais elevadas, de 41,5 °C, e mais baixas, de 5 °C. Assim, garante-se que o produto, mesmo quando sujeito a estas variações de temperaturas aquando do seu armazenamento e transporte, se mantêm estável ao longo de um mês. Por outro lado, os estudos acelerados demonstram que esta formulação é suscetível a alterações físico-químicas após indução de hidrólise ácida e básica e oxidação, com degradação ou transformação química da glucose. Para além disso, verifica-se promoção da precipitação de sais, como acontece com os iões K^+ , que precipitam na forma de KCl, na presença de HCl 0,1 M. Será também importante avaliar, posteriormente, a influência destas condições na estabilidade do composto orgânico cinamaldeído, presente nesta formulação. Algo que requereria mais tempo de estudo de forma a desenvolver e validar um método de extração deste composto, para posterior dissolução em isooctano e injeção no GC-FID.

3.2. Estudo da estabilidade da formulação com a emulsão de óleo de coco

A estabilidade da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco foi avaliada após sujeitar esta a diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 41,5 °C) e induzir hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M) e oxidação desta, com 3 % de H_2O_2 . Os parâmetros físico-químicos, incluindo a aparência, o pH, o índice de peróxidos, as concentrações dos vários componentes da mistura, e os parâmetros microbiológicos (*Salmonella*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, microrganismos totais, *Estafilococcus* e bolores e leveduras) foram avaliados após 1, 15 e 30 dias, quando o produto foi sujeito às diferentes temperaturas. Relativamente aos estudos acelerados, nestes monitorizaram-se apenas os parâmetros físico-químicos, mencionados anteriormente, 1 e 4 dias após a indução de hidrólise ácida e básica e oxidação desta formulação. Assim, foi possível avaliar quais as condições adequadas para a garantia da estabilidade desta formulação.

A avaliação da aparência do produto contendo apenas a emulsão de óleo de coco foi realizada através da obtenção do espectro de absorvância na região do visível, entre os 380-720 nm, a diferentes temperaturas. Através da análise dos resultados obtidos (**figura 32**), verificou-se espectros com valores de absorvância superiores aos obtidos para a formulação de cinamaldeído, anteriormente analisada e uma aparência mais esbranquiçada. Esta coloração não varia ao longo do tempo, nem entre diferentes condições de temperatura. Tendo em conta isto, e o facto de que o óleo de coco solidifica à superfície da solução a temperaturas inferiores a 25 °C, associa-se esta alteração na aparência do produto à presença dos emulsificantes utilizados na emulsão do óleo de coco. Ao longo do tempo, verificam-se espectros semelhantes para as mesmas condições, sendo que, entre condições no dia 15 e no dia 30, verifica-se uma tendência para a sobreposição dos espectros nas condições de 25 °C e 41,5 °C. Enquanto que, os espectros obtidos para a condição a 5 °C apresentam valores de absorvância ligeiramente inferiores, mas não o suficiente para uma alteração da turbidez visual desta formulação. Assim, verifica-se que após um mês a formulação de óleo de coco, mesmo quando sujeita a temperaturas elevadas, de 41,5 °C, não demonstra alterações na sua aparência, que poderiam ser indesejáveis.

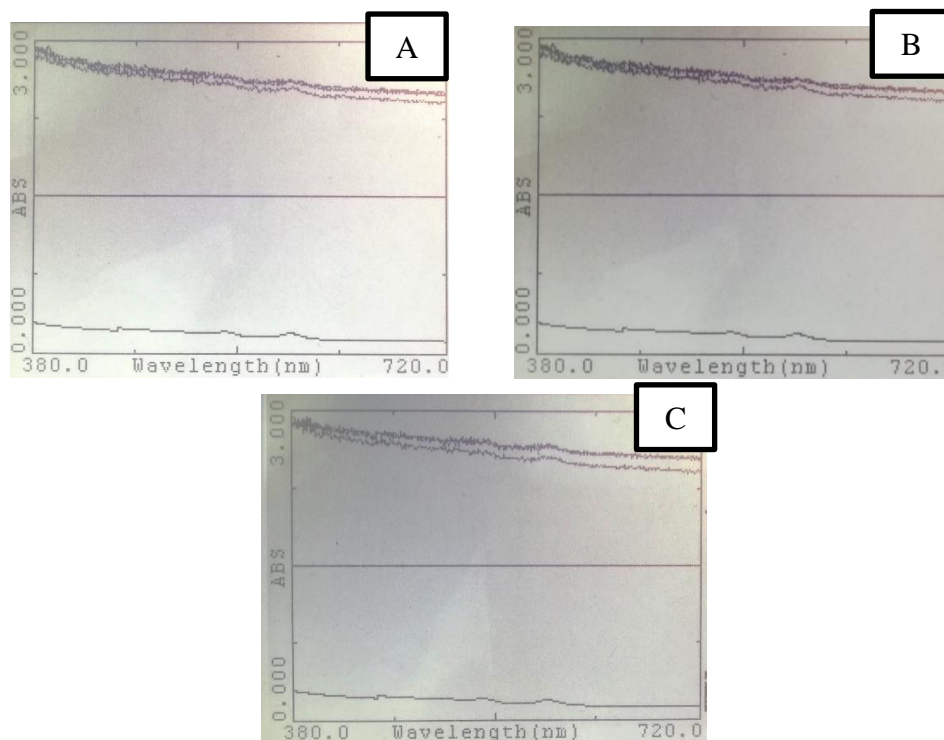


Figura 32 – Espectros da absorvância, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos por análise da solução através de espectrofotómetro de UV/Visível, nos dias 1 (A), 15 (B) e 30 (C) de estudo a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A avaliação do parâmetro químico pH foi realizada nos dias 1, 15 e 30 de estudo a diferentes temperaturas, refletindo possíveis alterações químicas que possam ocorrer nesta formulação, ao longo do tempo, aquando do armazenamento e transporte do produto. Os valores obtidos (**figura 33**), no início do estudo foram de 4,56 para ambas as condições de temperatura em estudo. Por outro lado, os resultados verificados no dia 15, foram de 4,59, 4,56 e 4,51 e no dia 30, de 4,57, 4,51 e 4,45, para as formulações de ácido láurico a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente. Através da análise do pH, verificou-se uma tendência para resultados contantes no dia 1 de estudo entre as diferentes condições de temperatura. Para além disso, ao longo do tempo parece existir uma tendência para uma ligeira diminuição do valor de pH da solução, principalmente a temperaturas superiores, obtendo-se tendência para valores constantes a 5 °C. Nos dias 15 e 30 de estudo, a tendência para ligeiras variações no valor de pH, dependendo da temperatura, poderão estar relacionadas com o princípio de Le Chatelier, já explicado para a formulação de cinamaldeído, com tendência para valores ligeiramente superiores a temperaturas inferiores e ligeiramente inferiores para temperaturas superiores do sistema. Apesar da tendência para estas ligeiras variações, estas são na ordem dos 0,1 e como tão tal, considera-se que a formulação de ácido láurico não tende a sofrer alterações químicas que modifiquem a concentração de protões em solução, mantendo-se estável neste sentido.

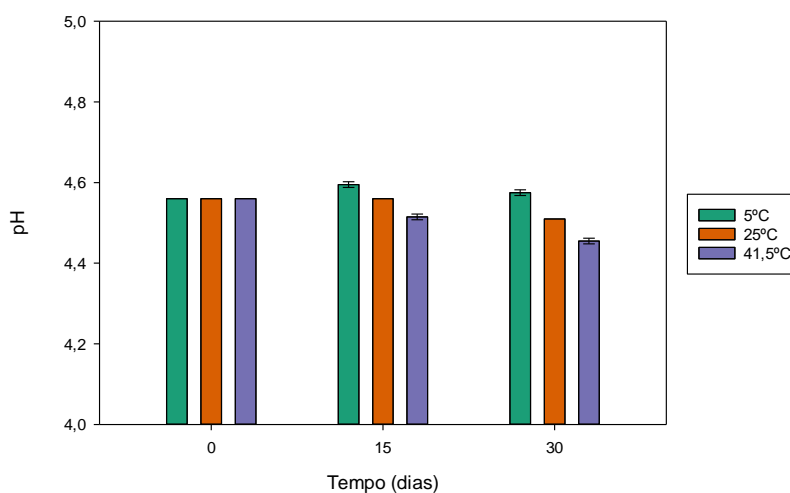


Figura 33- Valores de pH, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

O índice de peróxidos foi também avaliado para a formulação de ácido láurico, sendo importante para avaliar a possível oxidação da gordura presente em solução. Analisando os resultados obtidos (**figura 34**), obtiveram-se índices de peróxidos de 0,08 para ambas as condições no dia 1, 0,15, 0,14 e 0,14 no dia 15 e 0,24, 0,16, 0,18 no dia 30, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respectivamente. Através da análise destes resultados, verificou-se uma tendência para valores constantes deste parâmetro, comparando as diferentes condições nos dias 1, 15 e 30 de estudo. No entanto, parece existir uma tendência para um ligeiro aumento do índice de peróxidos ao longo do tempo para as diferentes temperaturas estudadas. Mas este será apenas confirmado com mais certezas através da realização de estudos mais prolongados. Assim, a formulação de ácido láurico demonstra não sofrer alterações significativas na oxidação da sua gordura, ao longo de mês, mesmo quando sujeita a temperatura elevadas, até 41,5 °C, aquando do seu armazenamento e transporte. Estes resultados também estão de acordo com os resultados obtidos para a manutenção da aparência do produto constante ao longo do tempo, sendo que a oxidação da gordura é muitas vezes visível através de alterações nas características organoléticas e visuais do produto.

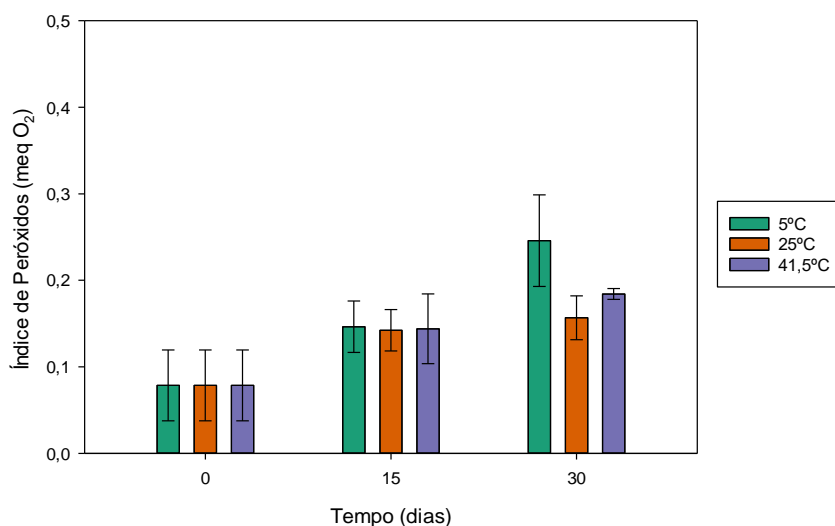


Figura 34- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A garantia da estabilidade da formulação de óleo de coco, passou também pela quantificação dos íons que compõem esta, de forma a avaliar a sua estabilidade e possível precipitação ao longo do tempo. Relativamente à avaliação da concentração de Na^+ , os valores obtidos foram de 1,28 g/L para ambas as condições no início do estudo, 1,22 g/L, 1,26 g/L e 1,04 g/L no dia 15 e 1,23 g/L, 1,25 g/L e 1,21 g/L no dia 30, para as formulações de óleo de coco a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 35A**). Estes resultados demonstram uma tendência para valores constantes ao longo do tempo, para as várias formulações, e comparando estas, tanto no início, como nos dias 15 e 30 de estudo. Apesar da tendência para uma ligeira diminuição da concentração de sódio da formulação no dia 15 a 41,5 °C, esta já não se verifica no dia 30 de estudo e corresponde a variações menores, que não põem em causa o potencial da formulação. Estes resultados estão de acordo com a valor de concentração teórica esperada de 1,20 g/L de Na^+ no produto. De seguida, avaliou-se também a concentração de K^+ , presente em solução. Obtiveram-se concentrações de 0,16 g/L e 0,15 g/L para ambas as condições de temperatura no início do estudo e no dia 30, respetivamente, e 0,14, 0,15 e 0,15 no dia 15, para as formulações de óleo de coco a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 35B**). Estes resultados demonstram uma tendência para valores constantes, ao longo do tempo, em cada uma das condições e entre diferentes condições, no dia 1, 15 e 30 de estudo. Estes resultados são de acordo com o esperado teoricamente de 0,16 g/L de K^+ . Por último, também foram quantificados os íons Cl^- , obtendo-se os valores de 3,15 g/L, para ambas as condições, no início do estudo. As concentrações obtidas no dia 15 foram de 1,45 g/L, 4,07 g/L e 2,78 g/L e no dia 30 foram de 3,17 g/L, 3,14 g/L e 3,11 g/L, para as formulações de óleo de coco a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 35C**). Através da análise dos resultados, verifica-se uma tendência para valores constantes das concentrações de Cl^- ao longo do tempo, para cada condição e comparando diferentes temperaturas. Apesar dos resultados terem demonstrado uma tendência para uma diminuição da concentração a 5 °C e 41,5 °C e aumento para os 25 °C no dia 15 de estudo, os valores tenderam para valores constantes no dia 30, relativamente ao dia 1, e estas variações são menores, não demonstrando influência da temperatura na estabilidade dos íons em solução. Para além disso, existe uma tendência para valores próximos da concentração teórica esperada de 2,86 g/L. Assim, conclui-se que, mesmo que a formulação de ácido láurico seja sujeita a temperaturas elevadas aquando do seu

armazenamento, os íões que a compõem estão estáveis ao longo de um mês, não sofrendo precipitação.

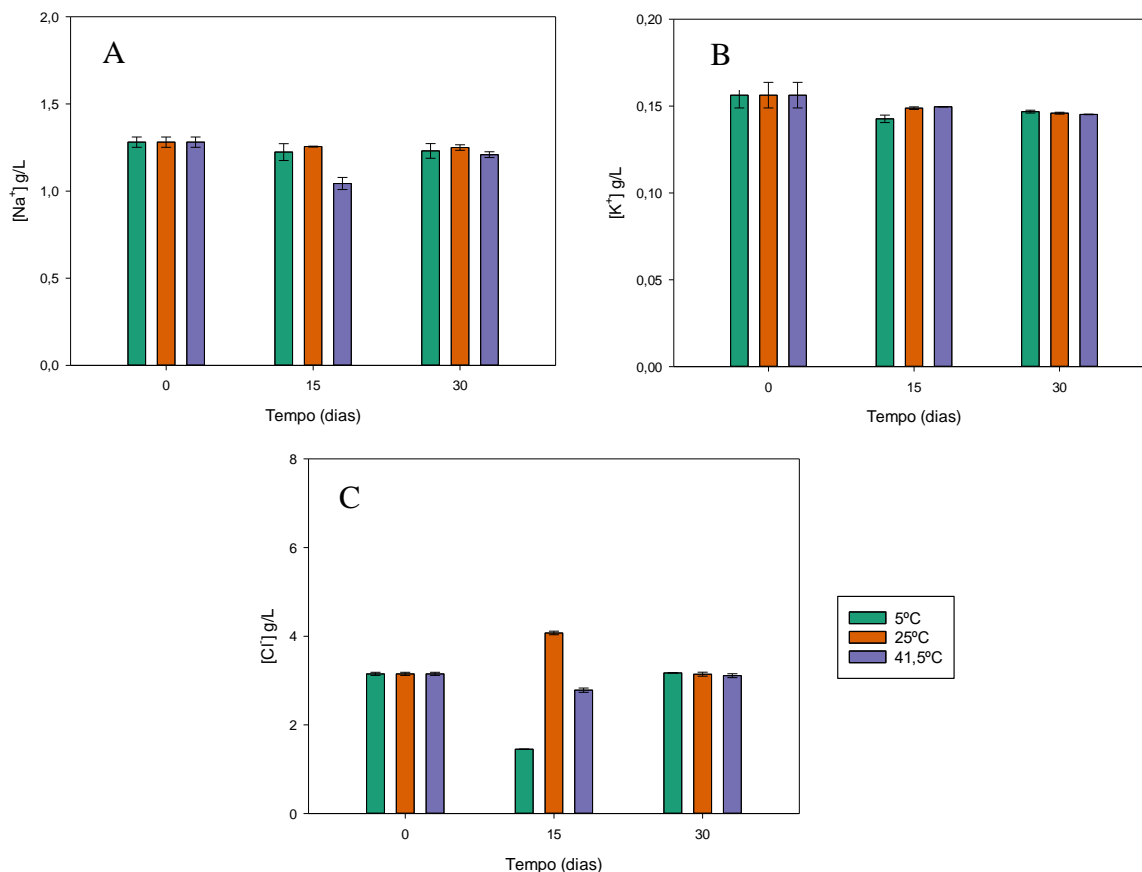


Figura 35- Valores da concentração de íões Na⁺ (A), K⁺ (B) e Cl⁻ (C), da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A avaliação da estabilidade do produto passou ainda pela avaliação de possíveis alterações na glucose que o constitui e na quantificação do ácido láurico. Relativamente à glucose (**figura 36**), obtiveram-se concentrações de 58,5 g/L para ambas as condições no início do estudo e de 49,8 g/L, 48,2 g/L e 51,4 g/L no dia 15, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente. Os cromatogramas obtidos, por HPLC, para estas amostras podem ser consultados no **anexo 13**. Também foi determinada a glucose no dia 30 de estudo, no entanto, por ausência de confiança nestes resultados, por mau funcionamento do HPLC, estas concentrações não foram apresentadas. Através da análise destes resultados, constata-se que os valores no dia 1 estão próximos no esperado, teórico adicionado à solução de 50,0 g/L, mas que existe uma tendência para uma ligeira diminuição da glucose em solução, para

as diferentes condições, ao longo do tempo. Tal como explicado anteriormente, para a formulação de cinamaldeído, a oxidação da glucose ao ar livre não ocorre a taxas perceptíveis nestas condições em solução e a única alteração que poderia promover a diminuição da concentração deste composto seria o desenvolvimento microbiológico. Desta forma, dados os resultados, espera-se um desenvolvimento microbiológico deste no dia 15 de estudo, que será demonstrado mais à frente. Assim, demonstra-se uma ausência de influência da temperatura na estabilidade da glucose em solução. No entanto, verifica-se uma tendência para a diminuição da glucose nesta formulação ao longo do tempo, possivelmente devido a desenvolvimento microbiológico em solução.

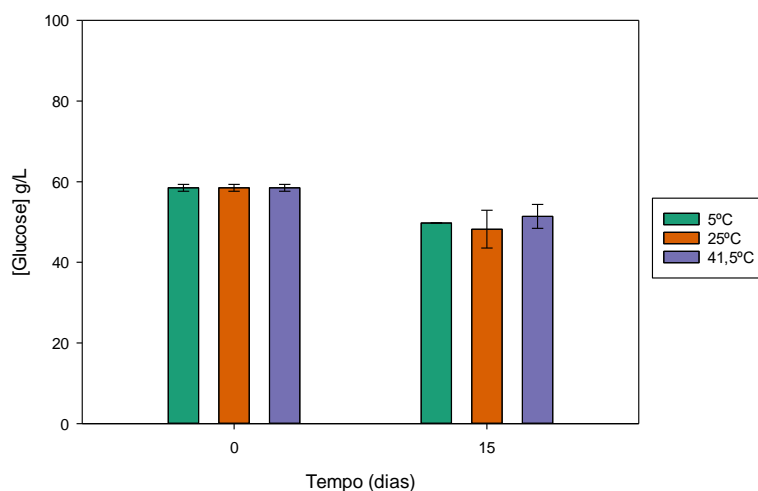


Figura 36- Valores da concentração de glucose, obtidos por HPLC, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 15 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Avaliou-se a estabilidade do ácido láurico presente na emulsão de óleo de coco, de forma a perceber se este composto ativo do produto se mantém estável ao longo do tempo, garantindo a sua estabilidade até ao momento da administração pelos leitões e atuação no trato gastrointestinal destes. As concentrações do ácido láurico em solução, nas diferentes condições, foram determinadas a partir de uma curva de calibração (**anexo 8**), previamente definida no método de perfil lipídico utilizado no equipamento de GC-FID. Através da análise dos cromatogramas obtidos por GC-FID (**anexo 14**), ao fim de um mês de estudo verificaram-se concentrações deste composto, aparecendo ao tempo de retenção de 6,8 minutos, de 1,6 g/L, 3,1 g/L e 8,3 g/L, para as formulações de ácido láurico a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 37**). Comparando estes valores com o valor teórico

adicionado à solução de 3,0 g/L, verifica-se uma tendência para a redução deste a 5 °C e concentrações acima do esperado a 41,5 °C. Estes resultados não estão de acordo com o esperado, uma vez que o ácido láurico é um ácido carboxílico, e como tal, de uma forma geral, é resistente a oxidação/degradação. Para além disso, verificaram-se valores baixos de índice de peróxidos para as formulações de ácido láurico, sujeitas às diferentes temperaturas, demonstrando uma ausência de oxidação do produto. Assim, poderá ter ocorrido uma distribuição não uniforme desta emulsão de óleo de coco para as embalagens de 1 L, aquando da produção desta formulação no misturador de líquidos. Esta hipótese também é reforçada para deteção deste composto, mesmo que em pequenas quantidades, num cromatograma obtido de uma formulação de cinamaldeído, que teoricamente não apresenta qualquer gordura na sua constituição. Uma melhor análise destes resultados poderia ter sido feita, se tivesse sido possível realizar estas determinações no início do estudo ou no dia 15, mas tal não foi possível por avaria do aparelho no laboratório da D.I.N., S.A.

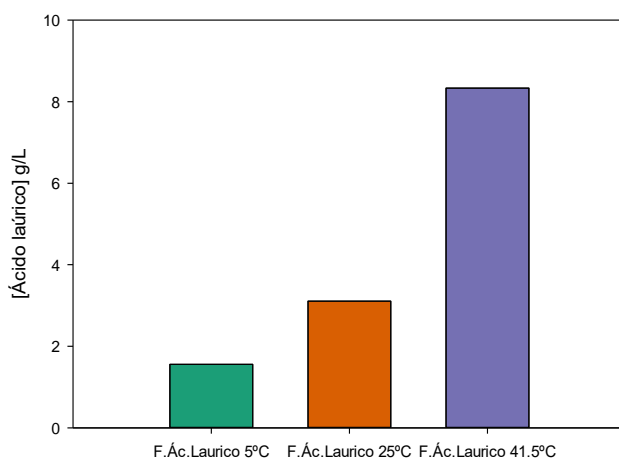


Figura 37- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos no dia 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Por fim, a avaliação da estabilidade microbiológica da formulação contendo ácido láurico também foi realizada, para além da avaliação físico-química, já descrita anteriormente. Através da análise dos resultados (**tabela 7**), verificou-se a ausência de desenvolvimento de *E.coli*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* e *Estafilococcus*, ao longo do mês de estudo. Obteve-se contagens de microrganismos totais de $1,1 \times 10^2$ para as várias formulações a diferentes temperaturas no dia 1 de estudo, mas ausência de desenvolvimento microbiológico por este método nos dias 15 e 30 de estudo. Isto pode ser explicado por possível contaminação aquando da preparação das placas no início do estudo. Por fim, verificou-se desenvolvimento de bolores e leveduras nesta formulação ao longo do tempo. Relativamente ao desenvolvimento de bolores, verificou-se contagens apenas para a formulação a 25 °C de $3,0 \times 10^1$ e 7×10^1 , no dia 15 e 30, respetivamente. Isto pode ser explicado pelo facto de que, aos 41,5 °C os bolores não se conseguem desenvolver tão facilmente como aos 25 °C, nem a temperaturas tão baixas como os 5 °C. Relativamente às leveduras, verificaram-se contagens de $1,0 \times 10^2$ para as várias temperaturas, no dia 1, e de $7,0 \times 10^1$, $2,2 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^1$ no dia 15, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente. Ao fim de um mês, apenas se verificou desenvolvimento destes fungos a 25 °C com contagem de 14×10^1 de leveduras. Estes resultados podem ser explicados pelo desenvolvimento de bolores unicelulares (leveduras) e de bolores pluricelulares (fungos) a pH ótimo entre 4,50 e 5,50, temperatura ótima próxima dos 25 °C e em ambientes húmidos, sendo o seu crescimento preponderante na formulação de ácido láurico a 25 °C. Assim, verifica-se que a formulação de óleo de coco é uma formulação propícia ao desenvolvimento fúngico, de bolores e leveduras. Este poderá ser contornado com a sugestão de refrigeração do produto ou até esterilização após embalamento, no caso de contaminação.

Tabela 7- Valores de pesquisa de *Salmonella* e contagem de Bolores, leveduras, *E. coli*, *Estafilococcus*, *Enterobacteriaceae* e microrganismos totais, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5°C, 25°C e 41.5°C.

Microrganismos	Temperatura (°C)/Tempo (dias)	0	15	30
Bolores	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	3,0x10 ¹	7x10 ¹
	41 °C	0	0	0
Leveduras	5 °C	1,0 x10 ²	7,0 x10 ¹	0
	25 °C	1,0 x10 ²	2,2x10 ³	14x10 ¹
	41 °C	1,0 x10 ²	1,0 x10 ¹	0
<i>Salmonella</i>	5 °C	Ausente	Ausente	Ausente
	25 °C	Ausente	Ausente	Ausente
	41 °C	Ausente	Ausente	Ausente
<i>E. coli</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
Microrganismos totais	5 °C	1,1x10 ²	0	0
	25 °C	1,1x10 ²	0	0
	41 °C	1,1x10 ²	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Estafilococcus</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0

O estudo de estabilidade da formulação de ácido láurico do produto também incluiu estudos acelerados. Estes foram realizados da mesma forma que na formulação de cinamaldeído, já descrita anteriormente, com a determinação dos mesmos parâmetros físico-químicos da formulação. Na formulação de ácido láurico também se determinou o pH, garantindo um pH ácido, aquando da adição do HCl 0,1 M ao produto, um pH básico, quando da adição de NaOH 0,1 M ao produto, e um pH próximo do da formulação de ácido láurico original, aquando da adição de 3 % H₂O₂. Através da análise dos resultados, verificou-se uma tendência para a redução do pH após a adição de HCl, para 1,49 e 1,46, nos dias 1 e 4 de estudo, respetivamente, e aumento do pH após a adição de NaOH, para 10,47 e 10,31, nos dias 1 e 4 de estudo, respetivamente (**figura 38**). Assim, garante-se a indução de hidrólise

ácida e básica da formulação após a adição de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M e a manutenção destas condições de stress ao longo do estudo.

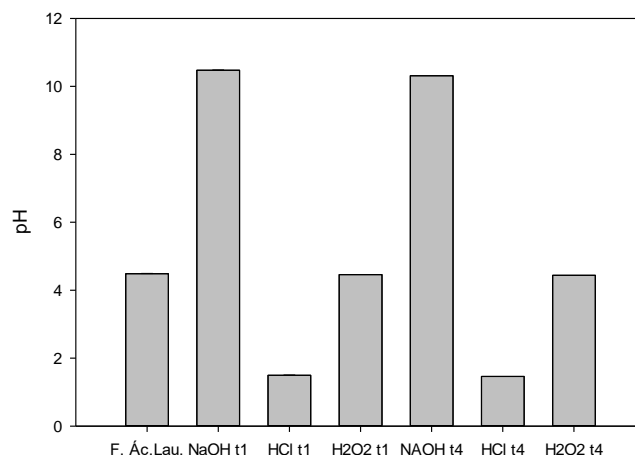


Figura 38- Valores de pH, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H₂O₂).

Nos estudos acelerados avaliou-se a aparência da formulação de ácido láurico sujeita às diferentes condições de stress e os seus índices de peróxidos. Relativamente à aparência da formulação, verificou-se uma aparência constante ao longo do tempo, com obtenção de espectros idênticos, para as várias condições em estudo, nos dias 1 e 4 de estudo (**figura 39**). Nestes espectros, obtiveram-se valores de absorvância inferiores aos obtidos para a formulação de ácido láurico original, para as várias condições de stress. Entre estas, obtiveram-se espectros com valores de absorvância ligeiramente superiores na formulação com adição de NaOH 0,1 M, comparativamente aos valores semelhantes obtidos para as condições de HCl 0,1 M e 3 % H₂O₂, com sobreposição destes últimos dois espectros. Estas alterações nos espectros de absorvância em função do comprimento de onda, não se refletem em alterações visuais na aparência do produto, comparando as condições de stress às quais a formulação de ácido láurico original é sujeita. Estas alterações nos valores de absorvância nas condições stress, não se refletem em alterações na absorvância da solução suficientes para provocar alterações indesejáveis na aparência visual do produto. Relativamente ao índice de peróxidos, verificou-se um valor de índice de peróxidos de 0,08 meq O₂ ativo, para a formulação de ácido láurico original. Enquanto que, obtiveram-se valores de 0,22 e 0,14 no dia 1 e valores de 0,12 e 0,05 no dia 4, para as formulações com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, respetivamente (**figura 40**). Através da análise destes resultados, contactou-se uma

tendência para valores de índice de peróxidos constantes para as várias condições de stress e ao longo do tempo. Apesar do resultado obtido, no dia 1 para a condição de NaOH, demonstrar tendência para um resultado ligeiramente superior, o desvio padrão associado a este valor médio obtido, a partir de um duplicado, é de 0,20 meq de O₂, remetendo para a tendência de igualdade de todos os resultados obtidos nesta determinação. Assim, a hidrólise ácida e básica com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, não promove a oxidação dos ácidos gordos presentes na formulação de ácido láurico, garantido a sua estabilidade em termos oxidativos, nestas condições. No entanto, estes resultados não estão de acordo com o esperado, uma vez que o índice de peróxidos é afetado pelo pH em solução, tal como analisado para a formulação de cinamaldeído.

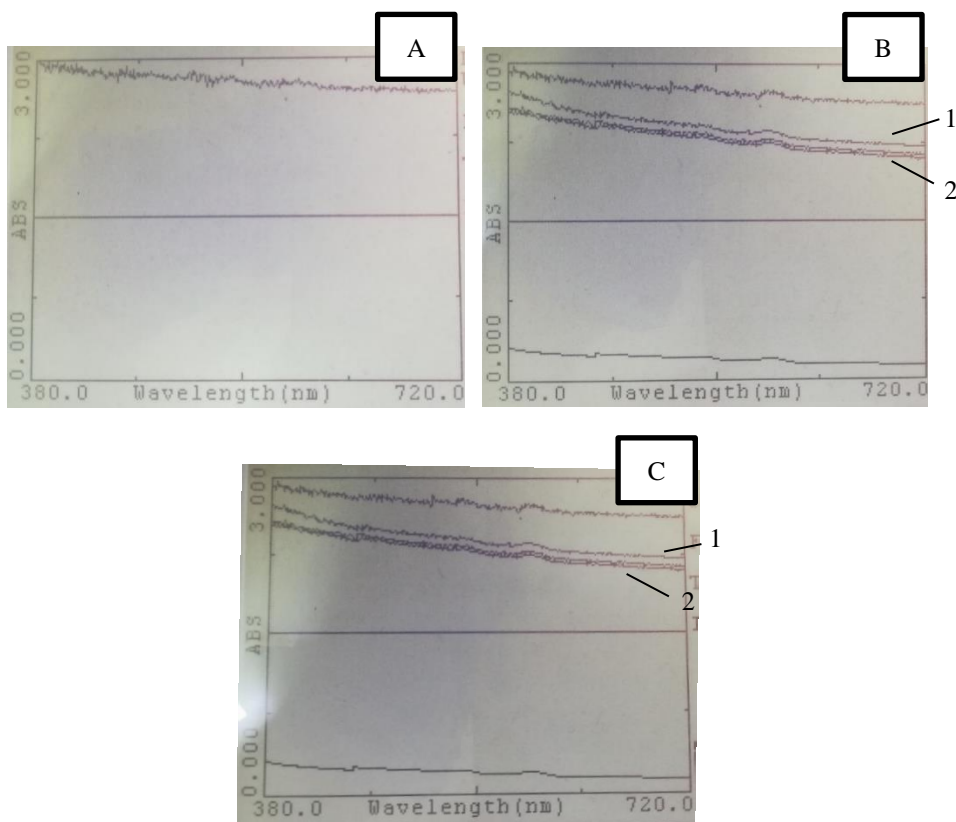


Figura 39 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco original (A) e as formulações obtidas colocando esta em meio básico (NaOH 0,1 M) (1), meio ácido (HCl 0,1 M) (2) e sob oxidação (3 % H₂O₂) (2), obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (B) e 4 (C) de estudo.

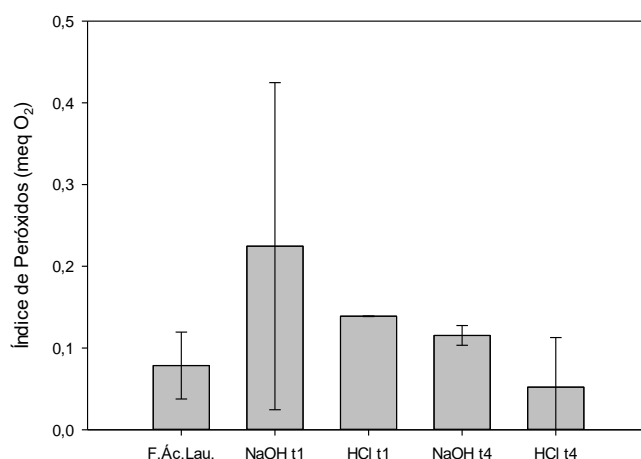


Figura 40- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M).

Nos estudos acelerados foram determinadas as concentrações dos constituintes da formulação de ácido láurico, de forma a entender de que forma estas condições de stress influenciam a estabilidade destes e se se formam novos compostos nestas condições, detetáveis por GC-FID. A quantificação dos iões Na^+ e K^+ foi determinada através das curvas de calibração presentes nos **anexos 10** e **11**, tal como foi realizado na formulação de cinamaldeído. Relativamente à quantificação de iões Na^+ , obtiveram-se valores de 1,20 g/L, 12,10 g/L, 1,80 g/L e 1,90 g/L, na formulação de ácido láurico original e com NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente, no dia 2 de estudo (**figura 41A**). Os resultados esperados são 1,03 g/L, 1,35 g/L, 0,77 g/L e 0,52 g/L, na formulação original, contendo NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente. Comparando estes valores, verifica-se que os resultados obtidos estão acima dos resultados esperados, demonstrando que houve contaminação da amostra com Na^+ , possivelmente proveniente do material de vidro utilizado, mesmo após desinfeção deste material em meio ácido. Relativamente ao K^+ , obtiveram-se resultados de 0,14 g/L, 0,10 g/L, 0,07 g/L e 0,07 g/L, para as formulações original, contendo NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente (**figura 41B**). Estas concentrações têm tendência para ser iguais ao esperado em termos teóricos, de 0,16 g/L, 0,12 g/L, 0,12 g/L e 0,08 g/L calculados para as formulações original, com NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente, exceto para a formulação sujeita a HCl. Nesta condição, verificou-se uma tendência para valores inferiores ao esperado, que poderá ser explicada pela precipitação dos iões K^+ em solução, na forma de KCl. Por fim, um último tipo de ião determinado neste estudo foi o Cl^- . O valor da concentração de Cl^- obtido na

formulação original de ácido láurico foi de 3,17 g/L. Por outro lado, os valores obtidos no dia 1 foram de 1,74 g/L, 3,50 g/L e 1,16 g/L, e no dia 4 foram de 2,62 g/L, 5,72 g/L e 1,63 g/L, para as formulações sujeitas a NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente (**figura 41C**). Os valores teóricos esperados são 2,86 g/L, 1,30 g/L, 3,60 g/L e 0,87 g/L, para as formulações original, com NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente. Comparando estes resultados, verificam-se valores próximos do esperado, para ambas as condições de stress, no dia 1 de estudo. No entanto, os resultados no dia 4 de estudo, demonstram uma tendência para valores ligeiramente acima do esperado. Isto pode ser explicado pelo facto de que a formulação, a partir da qual se prepararam as soluções sob stress, já apresentava maior quantidade de cloretos que a esperada de 2,86 g/L, traduzindo-se num ligeiro aumento dos valores da concentração de cloretos, medida nas várias condições de stress, no dia 4 de estudo. Assim, pode-se verificar uma influência da hidrólise ácida e básica na indução da precipitação de alguns iões em solução e que esta tendência se mantém ao longo do tempo, como verificado para os iões K⁺, após a adição de HCl.

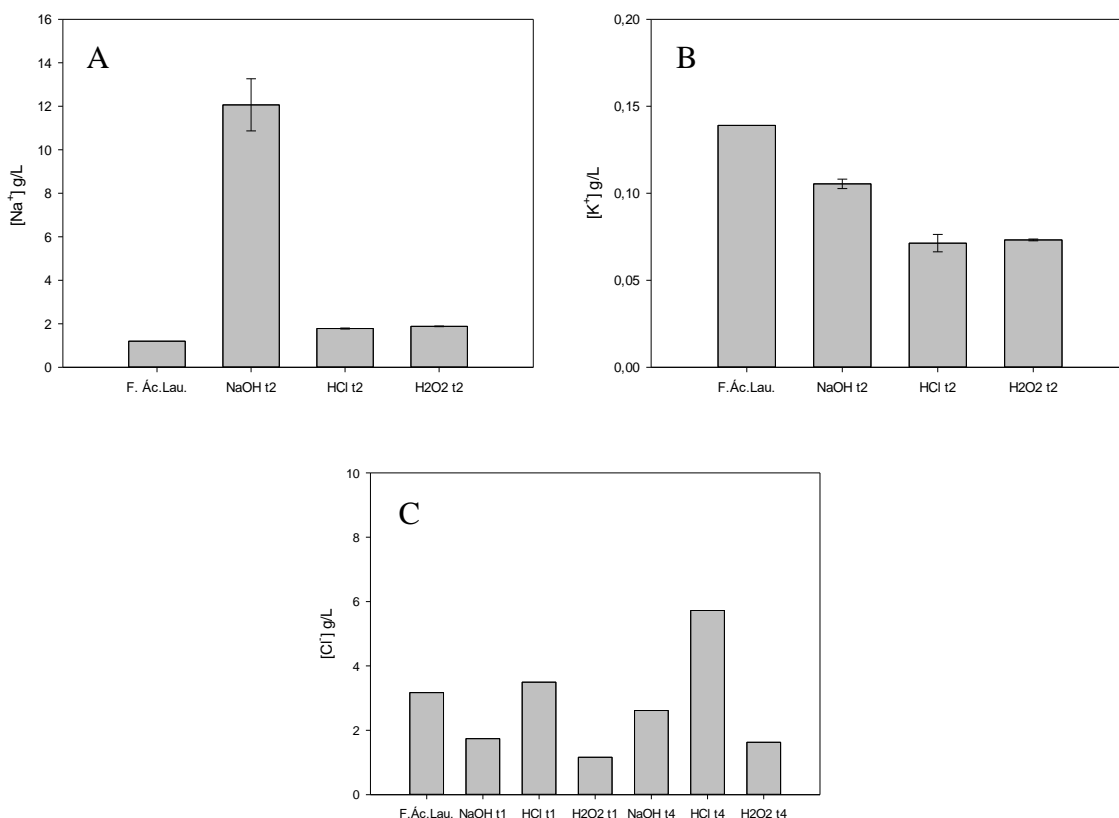


Figura 41- Valores da concentração de iões Na⁺ (A) e K⁺ (B), obtidos no dia 2 de estudo e de Cl⁻ (C), obtidos nos dias 1 e 4 de estudo, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H₂O₂).

Na avaliação da estabilidade acelerada da formulação de ácido láurico, avaliou-se também o possível efeito da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade da glucose que esta contém, em solução aquosa. Através da análise dos cromatogramas (**figura 42**), verificou-se para ambas as condições de stress, nos dias 1 e 4 de estudo, a ausência do pico característica da glucose, ao tempo de retenção de 3,4 minutos, obtido no padrão com 1 % de glucose. Relativamente às formulações de ácido láurico com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, verifica-se uma tendência para o aparecimento de dois picos no cromatograma, com tempos de retenção de 4,4 e 5,3 minutos, tanto no dia 1 como também no dia 4 de estudo. Por outro lado, na formulação contendo H₂O₂, constata-se a tendência para o aparecimento também destes picos no dia 1 de estudo, enquanto que no dia 4 de estudo apenas se verifica o aparecimento de um único pico, ao tempo de retenção 5,4 minutos. Estas alterações poderiam sugerir a degradação total da glucose em solução. No entanto, comparando estes picos com os picos do cromatograma obtido, para uma solução de 1 % de glucose, frutose e sacarose, é possível detetar, aos 5 minutos, o pico característico da sacarose. Tendo em conta que, a glucose poderá sofrer alterações na presença de HCl e NaOH, que promovam a sua conversão em frutose e, ainda, a dimerização de monómeros, poderá se estar, efetivamente, a detetar sacarose nas amostras, tal como já foi discutido anteriormente, para a formulação de cinamaldeído. Para além destas alterações, a glucose poderá sofrer epimerização, glicosilação e oxidação, que poderão também promover a redução desta em solução na formulação de óleo de coco, nestas condições. Assim, demonstra-se que a glucose é passível de transformação/degradação em solução, quando presente em meio ácido, com HCl 0,1 M, meio básico, com NaOH 0,1 M e na presença de H₂O₂.

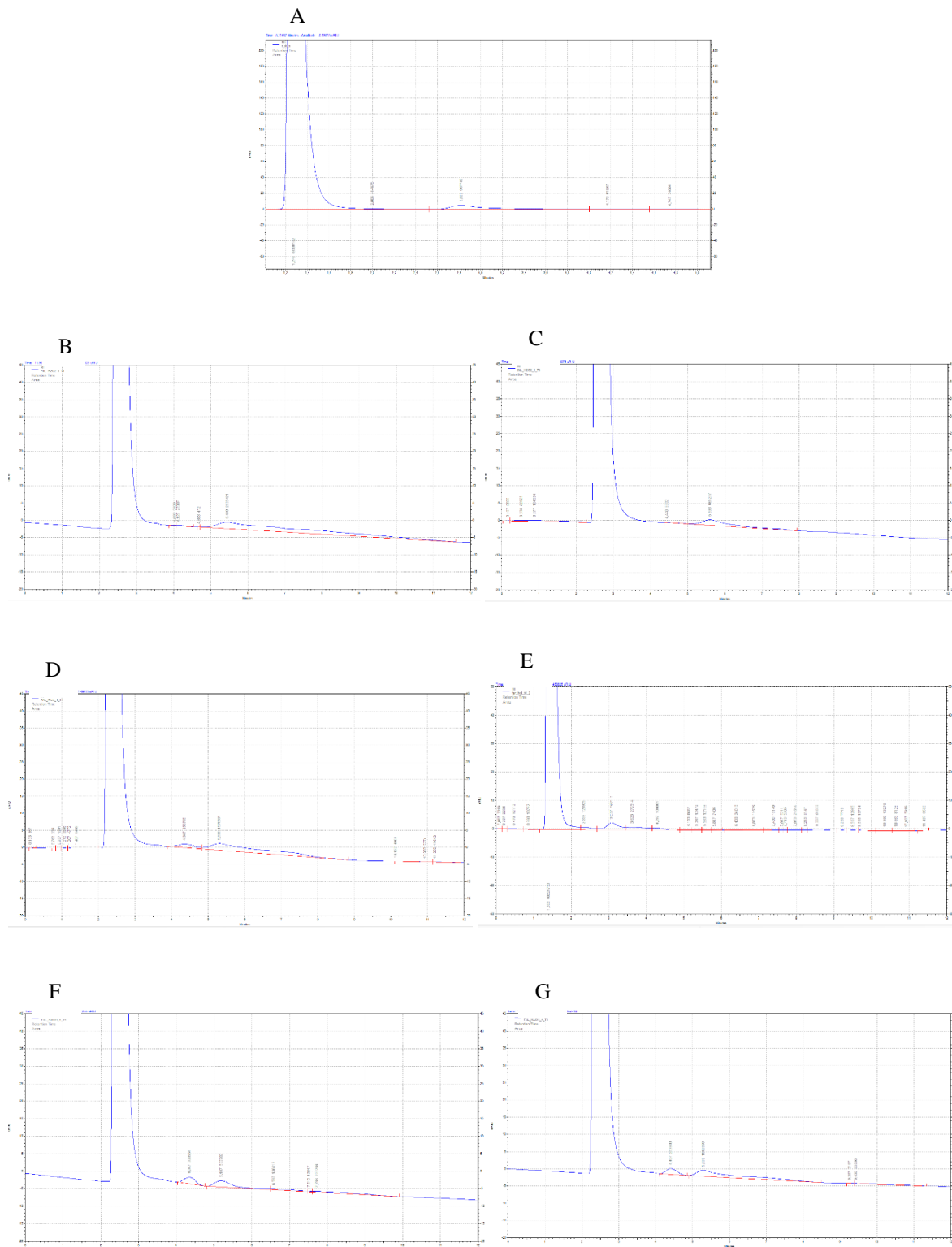


Figura 42- Cromatogramas da concentração de glucose, avaliada por HPLC, com um detector RI, obtidos para a formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco (A), a partir da qual se prepararam as soluções sob stress, e para esta após indução de oxidação (3 % H₂O₂) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M), nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo.

Por fim, avaliou-se a possível indução de alterações, destas condições de stress, na gordura presente em solução, refletindo-se em possível diminuição da concentração do ácido gordo em maior concentração em solução, o ácido láurico. Através da análise dos cromatogramas obtidos por GC-FID (**figura 43**), verificaram-se concentrações deste composto de 9,0 g/L para a formulação original e 8,2 g/L, 7,6 g/L e 8,5 g/L, no dia 1, e 8,3 g/L, 7,8 g/L e 9,1 g/L, no dia 4 de estudo, para as formulações contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente (**figura 44**). É possível constatar uma tendência para a valores constantes das concentrações das várias formulações ao longo do tempo. No entanto, estes resultados estão acima do esperado em termos teóricos e calculados de 3,0 g/L, 2,3 g/L, 2,3 g/L e 1,5 g/L para a formulações original, com NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente. Tal como já se tinha verificado anteriormente, a distribuição da gordura, aquando da sua preparação no misturador de líquidos em grandes quantidades, para as embalagens de 1 L demonstra não ser uniforme. Mas tendo em conta o valor real de concentração de 9,0 g/L para a formulação original, utilizada para a preparação das outras soluções das condições de stress, esperam-se concentrações de ácido láurico de 6,8 g/L, 6,8 g/L e 4,5 g/L, para as formulações contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente. Mesmo assim, verifica-se uma tendência para valores superiores aos esperados, considerando que possa ter existido contaminação aquando da extração da gordura por alguma gordura que possa ter ficado nas cartuxas de outras amostras, submetidas, anteriormente, à extração da sua gordura. No entanto, apesar destes resultados estarem acima do esperado, verifica-se que existe uma tendência para a ausência de degradação oxidativa do ácido láurico e de influência de hidrólise ácida e básica, com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, na sua estabilidade. Uma vez que, caso contrário, verificar-se-ia reduções drásticas deste composto. Tendo em conta que o ácido láurico é um ácido carboxílico, espera-se, geralmente, que este seja resistente a possíveis degradações nestas condições, tal como verificado. Assim, existe uma hipótese de resistência do ácido láurico, como ácido carboxílico, a degradação por hidrólise ácida e básica e oxidação, nestas condições estudadas.

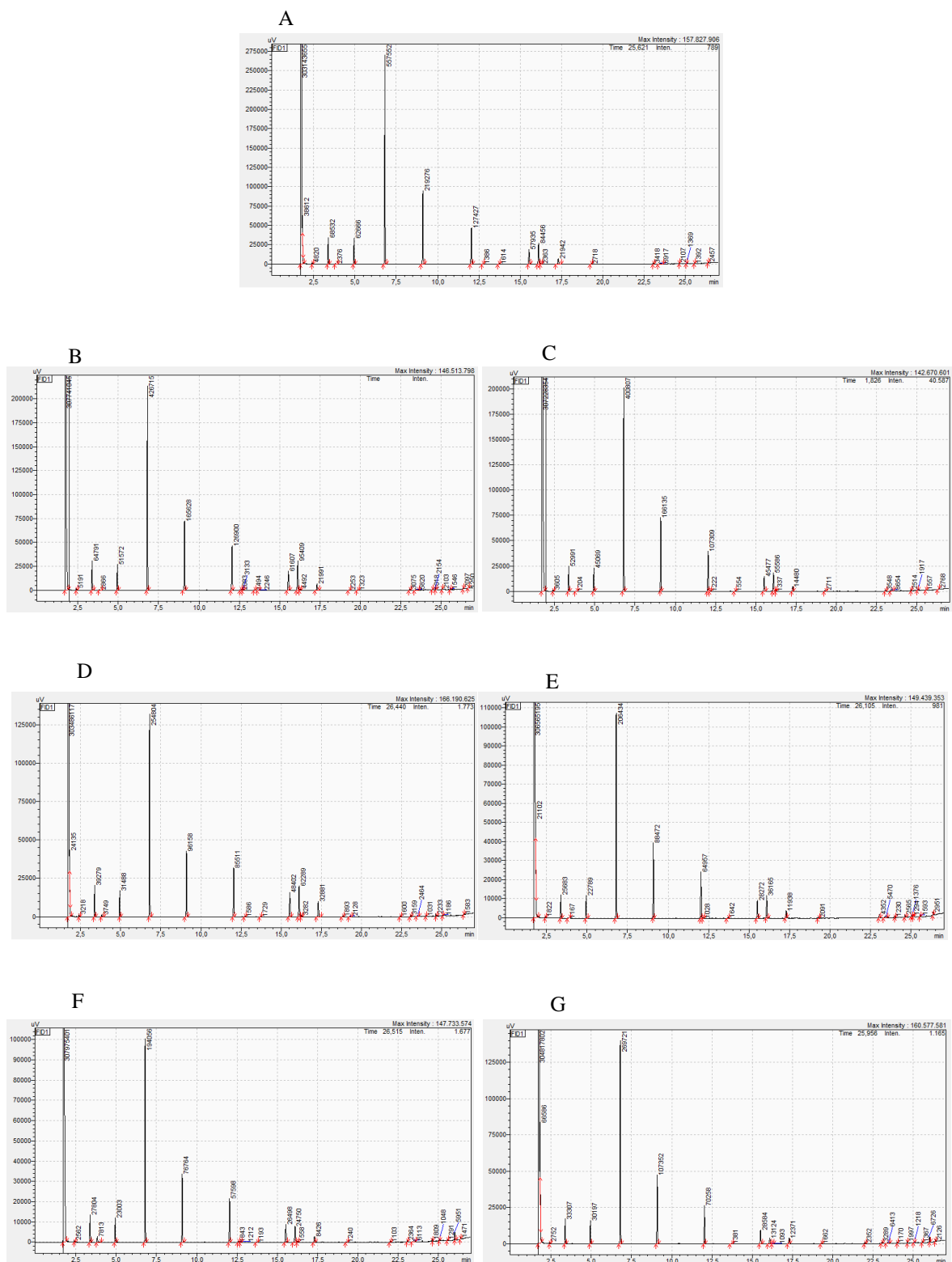


Figura 43- Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtido por GC-FID após injeção desta formulação original (A), a partir da qual se preparam as soluções de stress dos estudos acelerados, e desta após indução de hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e oxidação (3 % H₂O₂) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo.

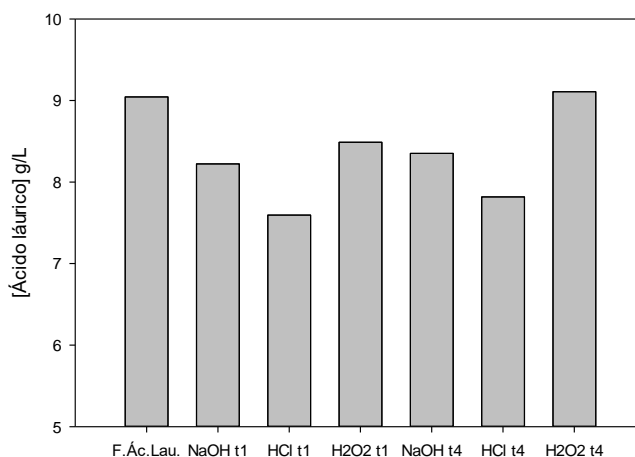


Figura 44- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H₂O₂).

Assim, conclui-se que, a formulação de ácido láurico demonstra ser estável em termos de ausência de oxidação e ausência de alteração do pH e dos seus constituintes, iões, Na⁺, K⁺ e Cl⁻ e ácido láurico. No entanto, verifica-se desenvolvimento microbiológico de leveduras e bolores, principalmente a temperaturas de 25 °C após um mês, e associado a esta uma diminuição da glucose no dia 15 de estudo. Isto poderá ser controlado, através da sugestão de armazenamento a temperaturas mais baixas e transporte refrigerado desta formulação. Para além disso, poderá ser pertinente uma esterilização do produto após empacotamento, prolongando o seu prazo de validade. Relativamente aos estudos acelerados, a hidrólise ácida parece influenciar a estabilidade dos iões K⁺, promovendo a sua precipitação, mas os restantes iões são estáveis às diferentes condições de stress estudadas. A glucose demonstra ser influenciada de forma igual por estas condições, verificando-se uma tendência para a redução da sua concentração e aparecimento de outros compostos derivados desta. Quanto ao ácido láurico, a sua concentração em princípio não será afetada por estas condições, no entanto devido aos resultados acima do esperado, seria necessário repetir o estudo, voltando a extrair a gordura e quantificá-lo, nos dias 1 e 4 após a preparação das soluções com NaOH, HCl e H₂O₂. Seria importante, ainda, a realização de ensaios de recuperação com o ácido láurico puro, para determinar a sua taxa de recuperação ao longo do método. Assim, em termos de estabilidade do produto aquando do seu armazenamento, esta é garantida ao longo de um mês caso seja garantida a refrigeração do produto, prevenindo o desenvolvimento de fungos, unicelulares e pluricelulares.

3.3. Estudo da estabilidade da formulação com cinamaldeído e emulsão de óleo de coco

A estabilidade da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco foi avaliada após sujeitar esta a diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 41,5 °C) e induzir hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M) e oxidação desta, com 3 % H₂O₂. Os parâmetros físico-químicos, incluindo a cor, o pH, o índice de peróxidos e as concentrações dos vários componentes da mistura, e os parâmetros microbiológicos (*Salmonella*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, microrganismos totais, *Estafilococcus* e bolores e leveduras), foram avaliados após 1, 15 e 30 dias, quando o produto foi sujeito às diferentes condições de estudo. Os componentes da mistura determinados incluem os íons sódio, potássio e cloreto, a glucose e o ácido láurico.

A avaliação da aparência do produto contendo tanto cinamaldeído como a emulsão de óleo de coco, avaliada por espectroscopia de UV/Visível, demonstra valores de absorvância elevados, semelhante ao obtido para o produto contendo apenas a emulsão de óleo de coco (**figura 45**). Estes dois produtos apresentam ambos uma coloração branca e uma turbidez superior ao produto contendo apenas cinamaldeído, que tem uma aparência transparente. Os espectros obtidos no dia 1 de estudo são semelhantes aos obtidos no dia 15 de estudo para as diferentes temperaturas. Nestes dias, verificou-se um espectro com valores de absorvância ligeiramente superiores para a formulação a 25 °C, comparativamente aos obtidos para as formulações 5 °C e 41,5 °C, estando estes últimos sobrepostos. No dia 30 do estudo, verifica-se um aumento dos valores de absorvância para a formulação a 41,5 °C, obtendo-se uma sobreposição dos espectros a 25 °C e 41,5 °C e o espectro da formulação a 5 °C com valores de absorvância ligeiramente inferiores. Assim, a formulação de cinamaldeído e ácido láurico, mesmo quando sujeita a elevadas temperaturas, de 41,5 °C, demonstra ser estável, em termos de ausência de alteração da sua aparência nestas condições, durante um mês.

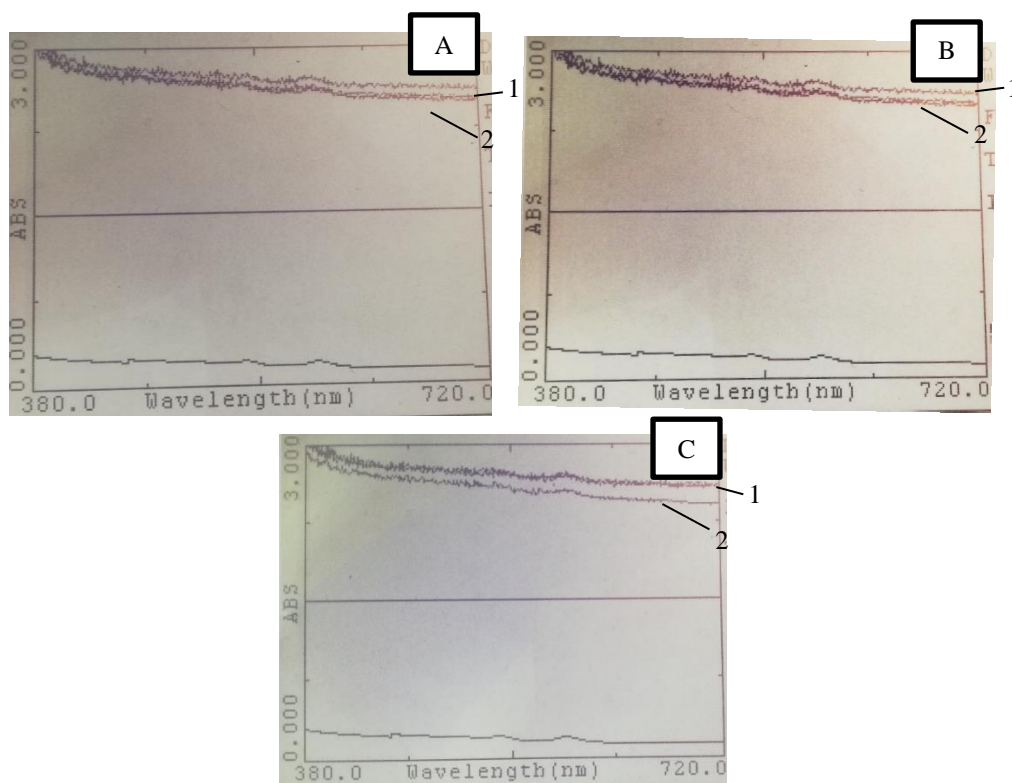


Figura 45– Espectros da absorvância, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro UV/Visível, nos dias 1 (A), 15 (B) e 30 (C) de estudo, a 5 °C (2A, 2B e 2C), 25 °C (1A, 1B e 1C) e 41,5 °C (2A, 2B e 1C).

A avaliação da influência da temperatura a que a formulação está sujeita no valor de pH, foi realizada monitorizando este valor ao longo de um mês em três formulações de cinamaldeído e ácido láurico a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. Através da análise dos resultados (**figura 46**), verificou-se uma tendência valores constantes de pH entre as várias condições no dia 1 de estudo. Nos dias 15 e 30 de estudo, demonstra-se uma tendência para a leitura de valores de pH ligeiramente inferiores para a formulação a temperaturas superiores e valores ligeiramente superiores para a formulação a temperaturas inferiores. Isto poderá ser explicado pela ausência de garantia, aquando da medição do pH, de homogeneidade nas temperaturas às quais as várias formulações estão, uma vez que a temperatura da amostra aquando da medição influencia o valor de pH medido segundo o Princípio de Le Chatelier, tal como explicado já anteriormente para as outras formulações. Os valores de pH obtidos foram de 4,56 para ambas as formulações no dia 1 de estudo. Enquanto que, no dia 15 obtiveram-se valores de pH de 4,59, 4,57 e 4,52, e no dia 30 de 4,55, 4,50, 4,47, para as

formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respectivamente. Assim é possível garantir a estabilidade da formulação de cinamaldeído e ácido láurico, em termos de reações que possam alterar em solução a concentrações de iões H⁺ e promover alterações no pH do produto.

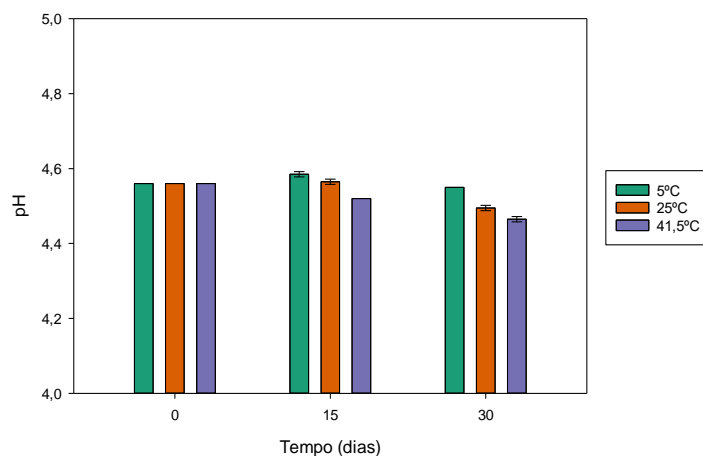


Figura 46- Valores de pH, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A avaliação da influência da temperatura à qual esta formulação poderá estar sujeita, aquando do seu armazenamento, na possível promoção da oxidação da gordura que a compõe foi investigada através da determinação do índice de peróxidos. Obtiveram-se valores deste de 0,04 meq de O₂ ativo para ambas as formulações no início do estudo e valores de 0,15 meq, 0,15 meq, 0,14 meq no dia 15 e 0,30 meq, 0,21 meq e 0,23 meq no dia 30 de estudo, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respectivamente (**figura 47**). Através destes resultados, demonstra-se a existência de uma tendência para um ligeiro aumento no índice de peróxidos ao longo do tempo para cada formulação e uma manutenção constante deste parâmetro, comparando as diferentes formulações nos diferentes dias de estudo, exceto a formulação a 5 °C no dia 30, com um valor ligeiramente superior às restantes formulações em estudo. Apesar da tendência para o aumento do índice de peróxidos, este é inferior a 10 meq de O₂ ativo, necessário para a garantia da segurança e qualidade alimentar de qualquer produto. Assim, demonstra-se uma oxidação da gordura, presente na amostra, não significativa e conclui-se que esta formulação é estável durante um mês, em termos oxidativos, mesmo quando sujeita a temperaturas até 41,5 °C.

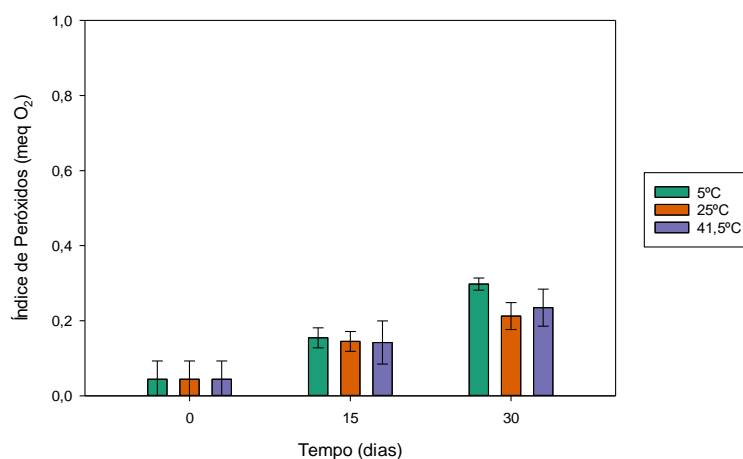


Figura 47- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A avaliação da estabilidade da formulação de cinamaldeído e ácido láurico, tal como realizado nas formulações anteriormente discutidas, incluiu a quantificação dos constituintes desta. Os íons Na^+ e K^+ foram quantificados através das curvas de calibração apresentadas nos **anexos 3** e **4**. Relativamente aos íons Na^+ , verificou-se uma tendência para valores constantes da concentração destes íons comparando as várias condições estudadas de temperatura, nos dias 1, 15 e 30 de estudo. Analisando a variação da concentração de íons Na^+ ao longo do tempo, constata-se uma tendência para valores constantes nos dias 1 e 30 de estudo, para as várias formulações, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C. No entanto, obteve-se uma tendência para ligeira diminuição da concentração de Na^+ no dia 15 de estudo, para as várias condições em estudo. Os resultados obtidos foram de 1,33 g/L para ambas as formulações, no início do estudo. Enquanto que, obtiveram-se valores de 1,02 g/L, 1,02 g/L e 0,95 g/L no dia 15 de estudo e 1,26 g/L, 1,23 g/L e 1,25 g/L de Na^+ no dia 30 de estudo, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 48A**). Os valores teóricos esperados são de 1,03 g/L de Na^+ , demonstrando que os valores obtidos estão próximos do esperado e que o ligeiro aumento destes, verificado nos dias 1 e 30 de estudo, poderá se dever a contaminações de Na^+ provenientes do material de vidro utilizado. Relativamente ao K^+ , obtiveram-se concentrações de 0,15 g/L para ambas as formulações, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, nos dias 1 e 15 de estudo, e valores de 0,14 g/L, 0,13 g/L, 0,13 g/L no dia 30 para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 48B**). Estes resultados são semelhantes ao teórico esperado, de 0,16 g/L, demonstrando uma tendência para valores

constantes de K^+ entre formulações nos diferentes dias de estudo e ao longo de um mês para cada uma destas formulações. Relativamente aos iões Cl^- , obtiveram-se concentrações destes de 2,12 g/L para ambas as formulações no início do estudo. Enquanto que, verificaram-se valores de 2,58 g/L, 3,46 g/L e 3,58 g/L no dia 15, e 3,01 g/L, 3,07 g/L e 3,12 g/L no dia 30 de estudo, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 48C**). A concentração de Cl^- teórica em solução na formulação de cinamaldeído e ácido láurico é de 2,86 g/L, demonstrando valores próximos deste e, assim, tendência para valores constante deste parâmetro comparando as diferentes formulações nos diferentes dias de estudo e nas três formulações ao longo do tempo. Assim, garante-se a estabilidade dos iões em solução na formulação de cinamaldeído e ácido láurico durante um mês, mesmo que esta seja sujeita a temperaturas elevadas, até aos 41,5 °C, aquando do seu armazenamento e transporte.

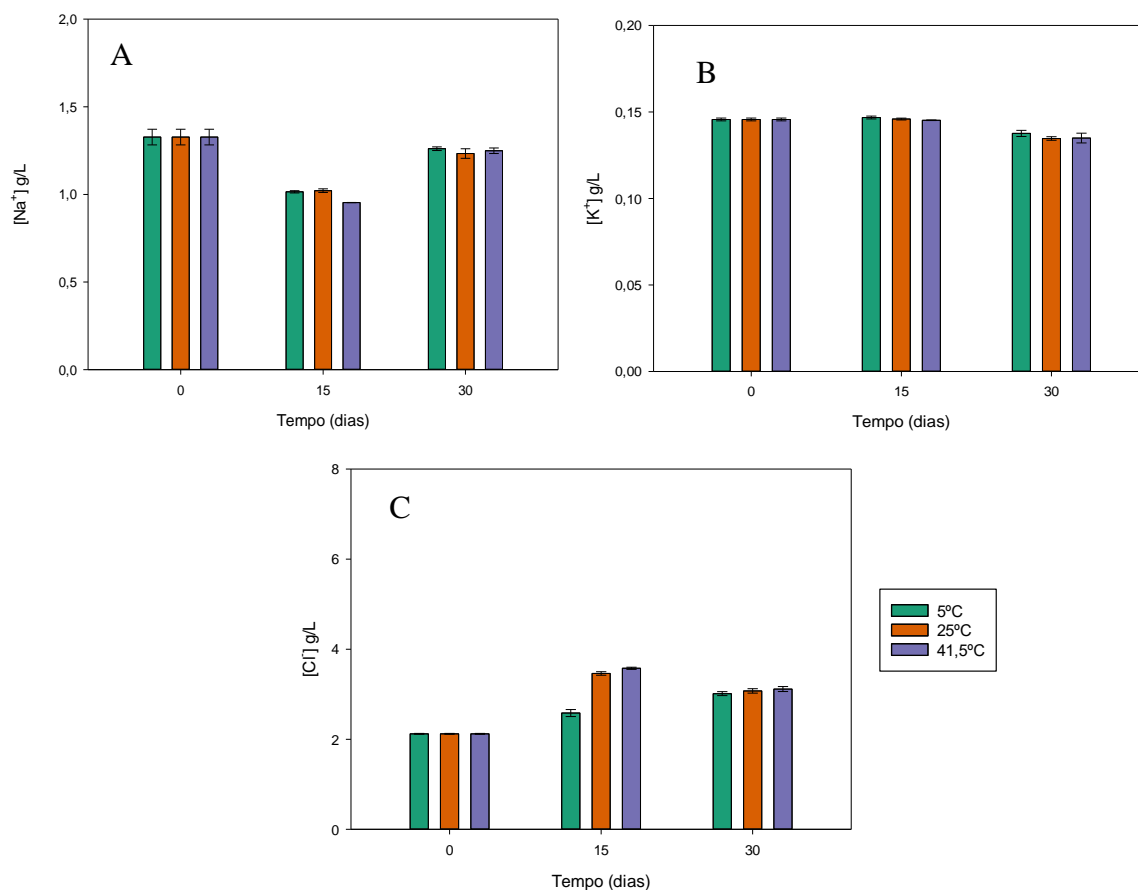


Figura 48- Valores da concentração de iões Na^+ (A), K^+ (B) e Cl^- (C), da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A quantificação da glucose em solução na formulação de cinamaldeído e ácido láurico a diferentes temperaturas foi realizada, avaliando se a temperatura à qual o produto possa ser sujeito influência a estabilidade deste composto maioritário em solução. A concentração de glucose obtida foi de 54,30 g/L para ambas as formulações no dia 1 de estudo. Enquanto que, os valores obtidos foram de 49,20 g/L, 49,20 g/L e 52,21 g/L no dia 15, para as formulações a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, respetivamente (**figura 49**). Os cromatogramas obtidos podem ser consultados no **anexo 15**. Também foi determinada a concentração de glucose em solução, no dia 30 de estudo, no entanto estes resultados não foram apresentados, por insegurança nestes, associada a falha no equipamento de HPLC. Nos dias 1 e 15 de estudo, verifica-se uma tendência para valores de glucose constantes e próximo do valor teórico esperado de 50,00 g/L. Tal como explicado, para as formulações anteriormente estudadas, a oxidação da glucose ao ar livre não ocorre a taxas perceptíveis nestas condições em solução e a única alteração que poderia promover a diminuição da concentração deste composto seria o desenvolvimento microbiológico. Desta forma, dados os resultados, espera-se uma ausência de desenvolvimento microbiológico nesta formulação, que será avaliado mais à frente. Assim, constata-se que a estabilidade da glucose presente na formulação de ácido láurico e cinamaldeído é garantida, durante um mês, mesmo quando esta está sujeita a temperaturas de 41.5 °C, em alturas de maior calor.

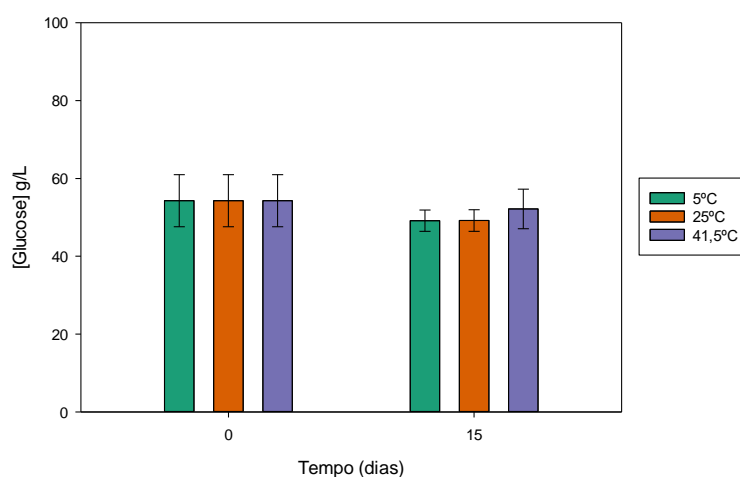


Figura 49- Valores da concentração de glucose, obtidos por HPLC, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 15 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

A formulação de cinamaldeído e ácido láurico apresenta gordura e como tal, foi realizada a determinação do perfil lípido desta, com o principal objetivo de monitorização da concentração do composto ativo de interesse, o ácido láurico, sujeito a diferentes temperaturas, após um mês de estudo. As concentrações de ácido láurico obtidas, ao tempo de retenção típico deste aos 6,8 minutos, no dia 30 de estudo foram de 2,7 g/L, 7,1 g/L e 2,6 g/L para as formulações de cinamaldeído e ácido láurico a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C (**figura 50**). Os cromatogramas destas amostras podem ser consultados no **anexo 16**. Esta monitorização não foi possível ser feita nos dias 1 e 15 de estudo, tal como foram determinadas as restantes condições, por impossibilidade de utilização do GC no laboratório, devido a avarias constantes. Estas determinações, ao fim de um mês, já foram possíveis após a aquisição de um novo equipamento pela D.I.N., mais sofisticado e com injeção automática, minimizando erros manuais nas suas determinações. Comparando os resultados obtidos, ao fim de um mês, com o valor teórico de 3,0 g/L de ácido láurico em solução, constata-se que não existe uma tendência para redução deste composto ao longo do tempo, nem que exista influência da temperatura na estabilidade deste. No entanto, obteve-se um valor mais elevado, de 7,1 g/L, demonstrando uma possível distribuição não uniforme da emulsão de óleo de coco pelas diferentes embalagens, aquando da sua preparação no misturador de líquidos em grandes quantidades. Seria importante a realização da repetição deste estudo com a determinação da concentração inicial deste composto no início para poder avaliar este aspeto. Outra possível explicação poderá ter sido uma contaminação de gordura nas cartuxas de amostras ou da formulação de ácido láurico ou desta formulação, anteriormente sujeitas a extração da sua gordura, aquando da extração da gordura com éter de petróleo desta amostra. Neste sentido, seria também importante a realização de ensaios de recuperação com ácido láurico puro, ao longo do método de extração e esterificação.

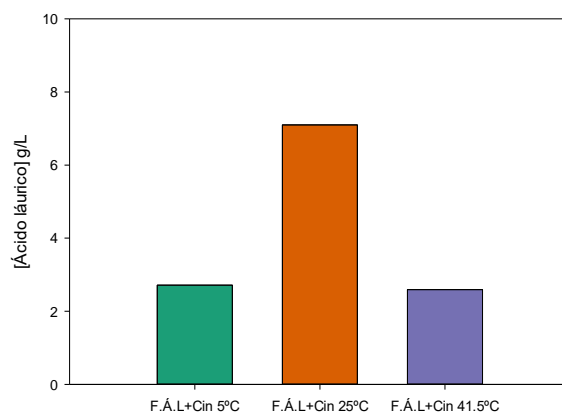


Figura 50- Valores da concentração de ácido láurico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos no dia 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Por fim, a avaliação da estabilidade de um produto carece de uma avaliação microbiológica, para além da avaliação físico-química anteriormente discutida. Após a avaliação microbiológica da formulação de cinamaldeído e ácido láurico, sujeita a diferentes temperaturas, verificou-se uma ausência total de desenvolvimento microbiológico de fungos, bolores e levedura, *Salmonella*, *E. coli*, microrganismos totais, *Enterobacteriaceae* e *Estafilococcus* (**tabela 8**). Estes resultados estão em conformidade com os resultados obtidos para a concentração de glucose. Esta ausência de desenvolvimento microbiológico, seria pouco provável para qualquer produto líquido, com elevadas atividade de água. No entanto, como se trata de um produto com pH ácido, este torna-se improvável, apenas com condições para o desenvolvimento de alguns bolores e leveduras resistentes a estas condições de pH. Assim, é possível garantir-se a estabilidade desta formulação em termos microbiológicos durante um mês, mesmo com a sua manutenção à temperatura ambiente ou temperaturas mais elevadas, até 41,5 °C.

Tabela 8- Valores de pesquisa de *Salmonella* e contagem de Bolores, leveduras, *E. coli*, *Estafilococcus*, *Enterobacteriaceae* e microrganismos totais, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

Microrganismos	Temperatura (°C)/Tempo (dias)	0	15	30
Bolores	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
Leveduras	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Salmonella</i>	5 °C	Ausente	Ausente	Ausente
	25 °C	Ausente	Ausente	Ausente
	41 °C	Ausente	Ausente	Ausente
<i>E. coli</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
Microrganismos totais	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0
<i>Estafilococcus</i>	5 °C	0	0	0
	25 °C	0	0	0
	41 °C	0	0	0

O estudo da estabilidade de um produto inclui estudos acelerados, induzindo condições de stress, de forma a avaliar o período de validade do produto e determinar possíveis produtos de degradação que se possam formar e vias de degradação associadas. A formulação de cinamaldeído e ácido láurico foi sujeita a hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M) e a oxidação (3 % H₂O₂), tal como já descrito nas outras formulações anteriormente analisadas. Após esta indução de stress, nesta formulação foram determinados diversos parâmetros nos dias 1 e 4 de estudo, exceto para a quantificação dos iões Na⁺ e K⁺, que só foi possível ser realizada no dia 2 de estudo nessa semana, devido a afluência de trabalho e o elevado número de clientes que o laboratório da D.I.N. apresenta na atualidade.

Para além disto, não foi realizada a determinação do índice de peróxidos para a condição de oxidação, uma vez que foi adicionada uma fonte de O_2 ativo à solução, utilizando o método adotado no laboratório, não seria possível discriminar o valor real do grau de oxidação da formulação nesta condição de stress. Para garantir a indução de hidrólise ácida e básica ao longo do estudo, determinou-se o pH das formulações. Através da análise dos resultados, obtiveram-se valores de pH de 4,5 para a formulação de cinamaldeído e ácido láurico original, a partir da qual se prepararam as soluções de indução de stress. No dia 1 de estudo, obtiveram-se valores de pH de 10,4, 1,5 e 4,7, e no dia 4 de 10,2, 1,5 e 4,5, para as formulações contendo NaOH, HCl e H_2O_2 , respetivamente (**figura 51**). Tal como esperado, constatou-se uma tendência para a diminuição do valor de pH após a adição do ácido forte HCl 0,1 M e para aumento deste após a adição da base forte NaOH 0,1 M. Para além disso, existe uma tendência para valores constantes de pH ao longo do tempo, para cada uma das condições. Tal, indica que existe uma estabilidade relativa da formulação em meio ácido e alcalino.

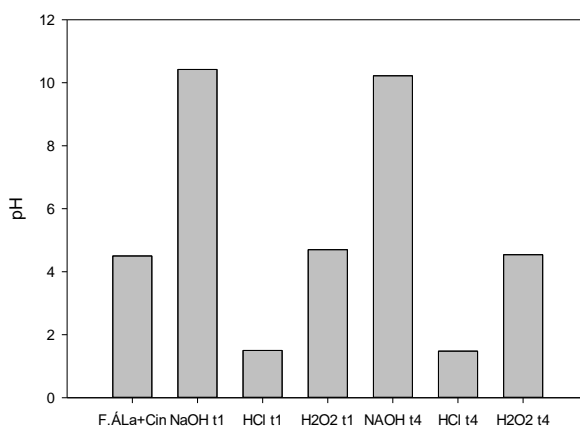


Figura 51- Valores de pH, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H_2O_2).

A avaliação da influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na aparência da formulação de cinamaldeído e ácido láurico foi também estudada por obtenção dos espectros de absorvância na região do visível em função do comprimento de onda. Através da análise dos espectros verificou-se uma tendência para espectros constantes ao longo do tempo para as várias condições de stress (**figura 52**). Após a adição de NaOH, HCl e H_2O_2 à formulação original verificou-se uma tendência para a diminuição dos valores de absorvância na região

do visível, sendo esta tendência maior para a formulação contendo HCl e menor para a formulação contendo NaOH. O espectro obtido após a adição H₂O₂ tem tendência para valores de absorvância entre os valores obtidos para as formulações com NaOH e HCl. Apesar destas tendências para alterações da absorvância entre condições de stress e comparativamente ao espectro da formulação original, não se verificam alterações visuais entre as condições de stress e a formulação original, significativas para induzir alterações visuais indesejáveis na formulação.

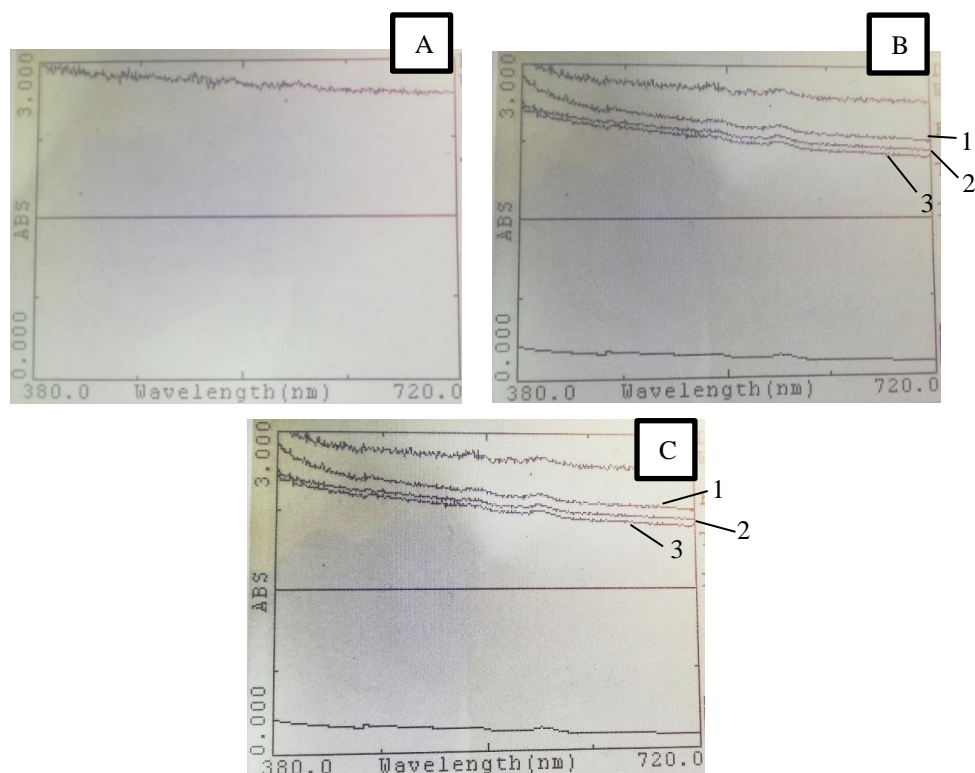


Figura 52 – Espectros da absorvância na região do visível, entre 380 e 720 nm, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco original (A), em meio básico (NaOH 0,1 M) (1), meio ácido (HCl 0,1 M) (3) e sob oxidação (3 % H₂O₂) (2), obtidos por análise da solução através de espectrofotômetro de UV/Visível, nos dias 1 (B) e 4 (C) de estudo.

Após a indução de stress na formulação de cinamaldeído e ácido láurico, foi determinado, entre outros parâmetros, o índice de peróxidos das formulações a diferentes condições, de forma avaliar a influência destes na oxidação do produto. O valor de índice de peróxidos obtido para a formulação original foi de 0,04 meq O₂ ativo, enquanto que para as formulações contendo NaOH e HCl, foram obtidos valores de 0,33 meq e 0,49 meq no dia 1 de estudo e 0,08 meq e 0,09 meq para o dia 4 de estudo, respetivamente (**figura 53**). Apesar

de se verificar uma tendência para o aumento do índice de peróxidos no dia 1 de estudo, estes resultados tendem a ser constantes comparando com os obtidos no dia 4 de estudo e verificados para a formulação original. De qualquer das formas, em qualquer condição e qualquer tempo de estudo, obtêm resultados seguros para a nutrição animal, abaixo dos 10,00 meq de O₂ ativo, garantindo-se, assim, a estabilidade da formulação em termos oxidativos, mesmo após indução de hidrólise ácida e básica.

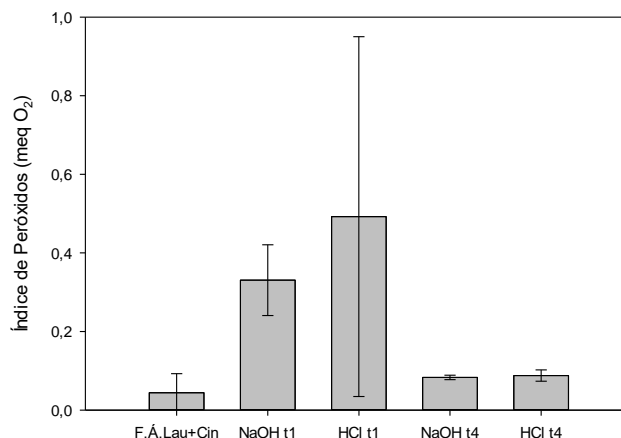


Figura 53- Valores de índice de peróxidos, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M).

A quantificação dos diferentes constituintes da formulação de cinamaldeído e ácido láurico foram também monitorizados após a indução de stress. A quantificação dos iões Na⁺ e K⁺ foi realizada, através das curvas de calibração, apresentadas nos **anexos 10 e 11**. Após a quantificação de Na⁺, obtiveram-se valores de 1,25 g/L, 12,81 g/L, 1,79 g/L e 1,88 g/L, para as formulações de cinamaldeído e ácido láurico original, contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente (**figura 54A**). Tendo em consideração que os valores teóricos esperados são de 1,03 g/L, 1,35 g/L, 0,77 g/L e 0,52 g/L, constata-se a tendência para a obtenção de valores acima do esperado. Isto poderá ser explicado por contaminações de iões provenientes do material de vidro utilizado para estas determinações, tal como também foi verificado para as formulações anteriores, contendo apenas cinamaldeído e apenas ácido láurico, utilizando-se sempre o mesmo tipo de material de vidro. Relativamente à determinação da concentração de K⁺, obtiveram-se valores de 0,13 g/L, 0,11 g/L, 0,07 g/L e 0,07 g/L para as formulações de cinamaldeído e ácido láurico original, contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente (**figura 54B**). Comparando estes valores com os teóricos esperados, de 0,16 g/L, 0,12 g/L,

0,12 g/L e 0,08 g/L para as formulações original, com NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente, constata-se uma tendência para valores correspondentes aos esperados para as várias condições em estudo, exceto para a indução de hidrólise ácida. Tal como verificado para as outras formulações, anteriormente estudadas e discutidas, a adição de HCl 0,1 M à formulação de cinamaldeído e ácido láurico demonstra promover uma diminuição da concentração de iões K⁺ em solução. Isto pode ser explicado pela promoção da precipitação destes iões, na forma de KCl, após a adição de HCl 0,1 M à formulação original. Contrariamente à quantificação de Na⁺ e K⁺, a quantidade de iões Cl⁻ foi realizada ao longo do tempo, nos dias 1 e 4 de estudo de stress. A concentração de Cl⁻ obtida para a formulação original foi de 3,73 g/L. Por outro lado, verificaram-se valores de 1,16 g/L, 3,33 g/L e 0,58 g/L no dia 1 de estudo e 2,61 g/L, 3,61 g/L e 2,41 g/L no dia 4 de estudo, para as formulações contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente (**figura 54C**). Comparando estes resultados com os teóricos em solução de 2,86 g/L, 2,34 g/L, 3,60 g/L e 1,43 g/L para as formulações original, contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respetivamente, verifica-se uma tendência para a redução da concentração de Cl⁻ após a indução de stress, principalmente de NaOH e H₂O₂, no dia 1 de estudo. Após 4 dias, já se verificam resultados próximos do teórico esperado com adição de NaOH e HCl, e apenas tendência para um valor acima do esperado após indução de oxidação da formulação. Na presença de NaOH e H₂O₂, não se esperam alterações na concentração de iões Cl⁻ em solução, uma vez que a solubilidade do NaCl em solução é elevada e o H₂O₂ não interfere na estabilidade destes iões em solução. As discrepâncias entre os resultados poderão ser explicadas por possíveis contaminações aquando da medição dos cloretos. Assim, pode-se concluir que existe uma influência da hidrólise ácida e básica na indução da precipitação de alguns iões em solução, como os iões K⁺, após a adição de HCl.

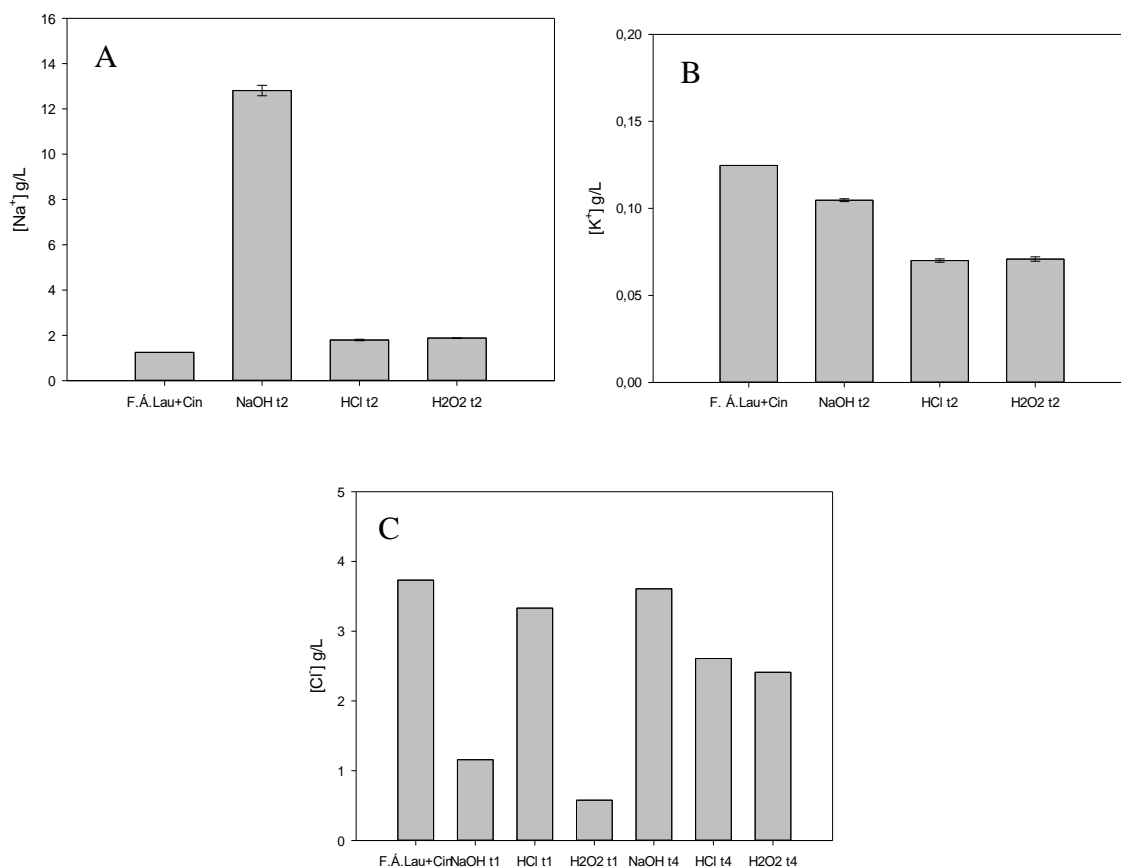


Figura 54- Valores da concentração de iões Na⁺ (A) e K⁺ (B), obtidos no dia 2 de estudo, e de Cl⁻ (C), obtidos nos dias 1 e 4 de estudo, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H₂O₂).

A avaliação da influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação na concentração de glucose, um componente maioritário nesta formulação, foi também realizada nos dias 1 e 4 de estudo. Após a análise da formulação de cinamaldeído e ácido láurico original, obteve-se uma concentração deste composto de 41,30 g/L. Após a análise dos cromatogramas obtidos para as formulações contendo NaOH, HCl e H₂O₂ nos dias 1 e 4 de estudo (**figura 55**), verificou-se uma ausência de qualquer pico, no tempo de retenção observado para os padrões de glucose. No cromatograma da formulação contendo H₂O₂ verificou-se o aparecimento de um pico, mas ao tempo de retenção de 5 minutos, no dia 1 e um pico, ao tempo de retenção 5,5 minutos, no dia 4 de estudo. Relativamente à formulação contendo HCl, verificou-se a presença de um pico, ao tempo de retenção de 5 minutos, no dia 1 de estudo e dois picos, aos tempos de retenção de 4,5 e 5,5 minutos, no dia 4 de estudo. Por fim, a formulação contendo NaOH, demonstrou uma tendência para o aparecimento sempre

de dois picos aos tempos de retenção 4,4 e 5,2 no dia 1 e 4,8 e 5,7 minutos no dia 4 de estudo. Estes resultados poderiam ser explicados tendo em conta, as alterações que a glucose poderá sofrer em meio ácido e básico. Estas poderá ser convertida em frutose, e ainda, principalmente em meio ácido, poder-se-á verificar a indução da dimerização destes monómeros. Esta hipótese é reforçada por estes resultados, comparando estes picos obtidos nas amostras com os picos obtidos após a injeção de um padrão contendo 1 % de glucose, frutose e sacarose (**anexo 12**), obtendo-se um pico típico de sacarose, ao tempo de retenção de 5 minutos, tal como verificado no cromatograma das amostras. No entanto, não é possível ter a certeza da presença de sacarose em solução apenas pela análise dos tempos de retenção. Para além destas alterações, a glucose poderá sofrer epimerização, glicosilação e oxidação, que poderão também promover a redução desta em solução nesta formulação, nestas condições. Assim, estes resultados demonstram que a hidrólise ácida e básica da formulação de cinamaldeído e ácido láurico promovem a degradação da glucose, com o desaparecimento desta e aparecimento de outras moléculas derivadas, a outros tempos de retenção.

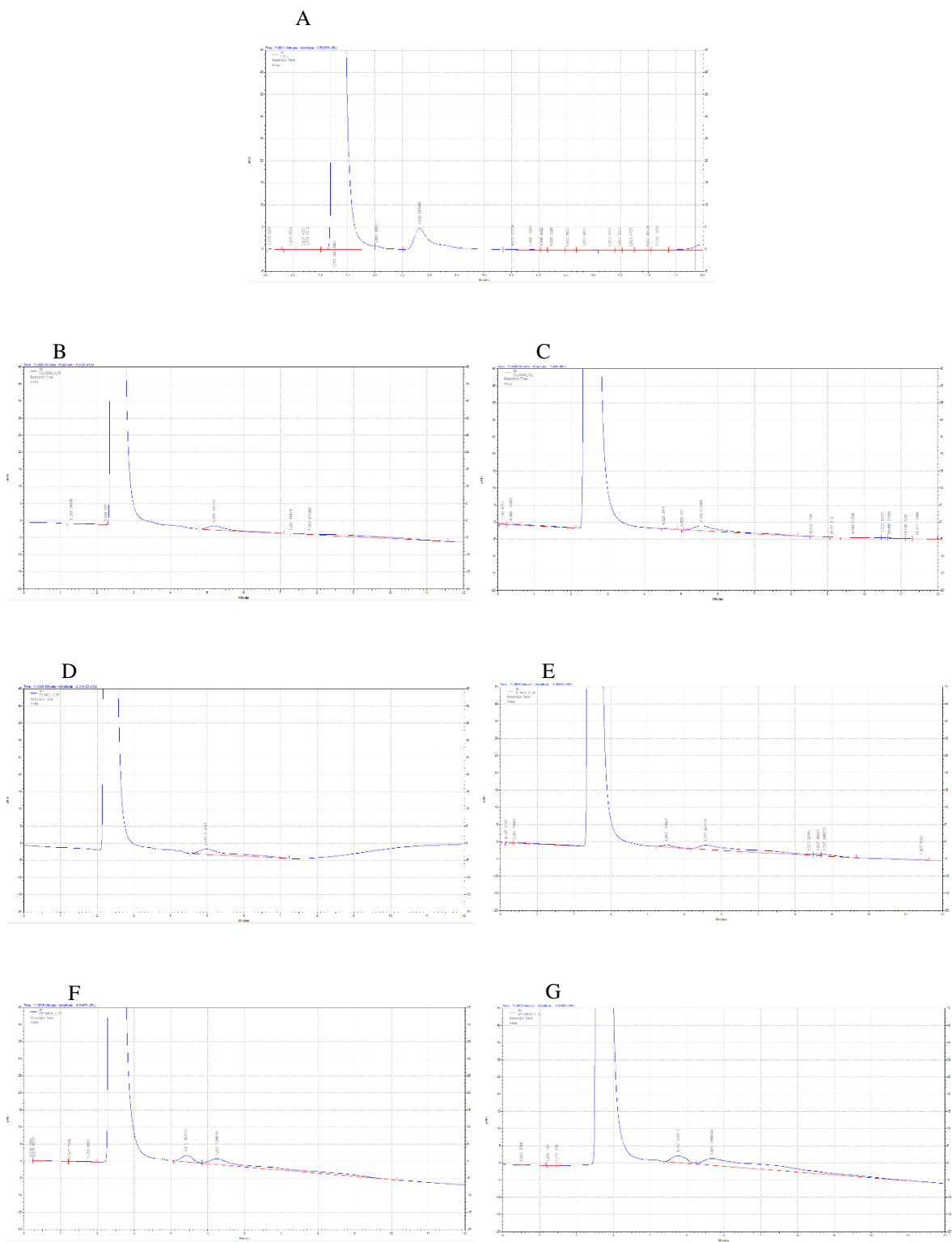


Figura 55- Cromatogramas da concentração de glicose, avaliada por HPLC com um detector RI da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos para esta formulação original (A), a partir da qual foram preparadas as soluções de indução de stress dos estudos acelerados, e desta após indução oxidação (3 % H₂O₂) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo.

Por fim, nos estudos acelerados avaliou-se a influência destas condições de stress na estabilidade do composto ativo maioritário da gordura presente em solução, o ácido láurico. Através da análise dos cromatogramas obtidos por GC-FID (**figura 56**), verificou-se uma concentração deste composto de 8,8 g/L na formulação de cinamaldeído e ácido láurico original. As concentrações foram de 8,3 g/L, 8,9 g/L e 4,5 g/L no dia 1 e 4,1 g/L, 8,8 g/L e 8,8 g/L no dia 4 de estudo, para as formulações contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respectivamente (**figura 57**). Comparando com os resultados teóricos esperados de 3,0 g/L, 2,3 g/L, 2,3 g/L e 1,5 g/L para as formulações original, contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respectivamente, verificam-se elevadas quantidades de ácido láurico em solução para ambas as condições e ao longo do tempo. Tendo em conta a concentração de 8,8 g/L da formulação original, seria de esperar concentrações de 6,6 g/L, 6,6 g/L e 4,4 g/L, para as formulações contendo NaOH, HCl e H₂O₂, respectivamente. Mesmo assim, esperar-se-ia concentrações mais baixas nas formulações contendo NaOH e HCl no dia 1 e nunca uma tendência para aumentar a concentração do dia 1 para o dia 4 na formulação contendo H₂O₂. Tendo em conta estes resultados, estas determinações deveriam de ser repetidas, uma vez que poderão existir contaminações com gorduras de outras amostras deste projeto nas cartuxas, aquando da sua extração com éter de petróleo. No entanto, os resultados obtidos não indicam existir uma tendência para um efeito da hidrólise ácida e básica e da oxidação na estabilidade deste composto, pois caso contrário teria existido uma tendência para reduções drásticas nas concentrações medidas deste composto. Assim, verifica-se uma tendência para ausência de degradação drástica do ácido láurico, nestas condições de stress, tal como esperado, uma vez que este se trata de um ácido carboxílico, geralmente, mais resistente a estas condições. No entanto, uma vez que foram obtidos resultados muito diferentes do esperado, seria interessante, ainda, a realização de testes de recuperação do ácido láurico, com este composto puro, ao longo do método da sua extração e esterificação.

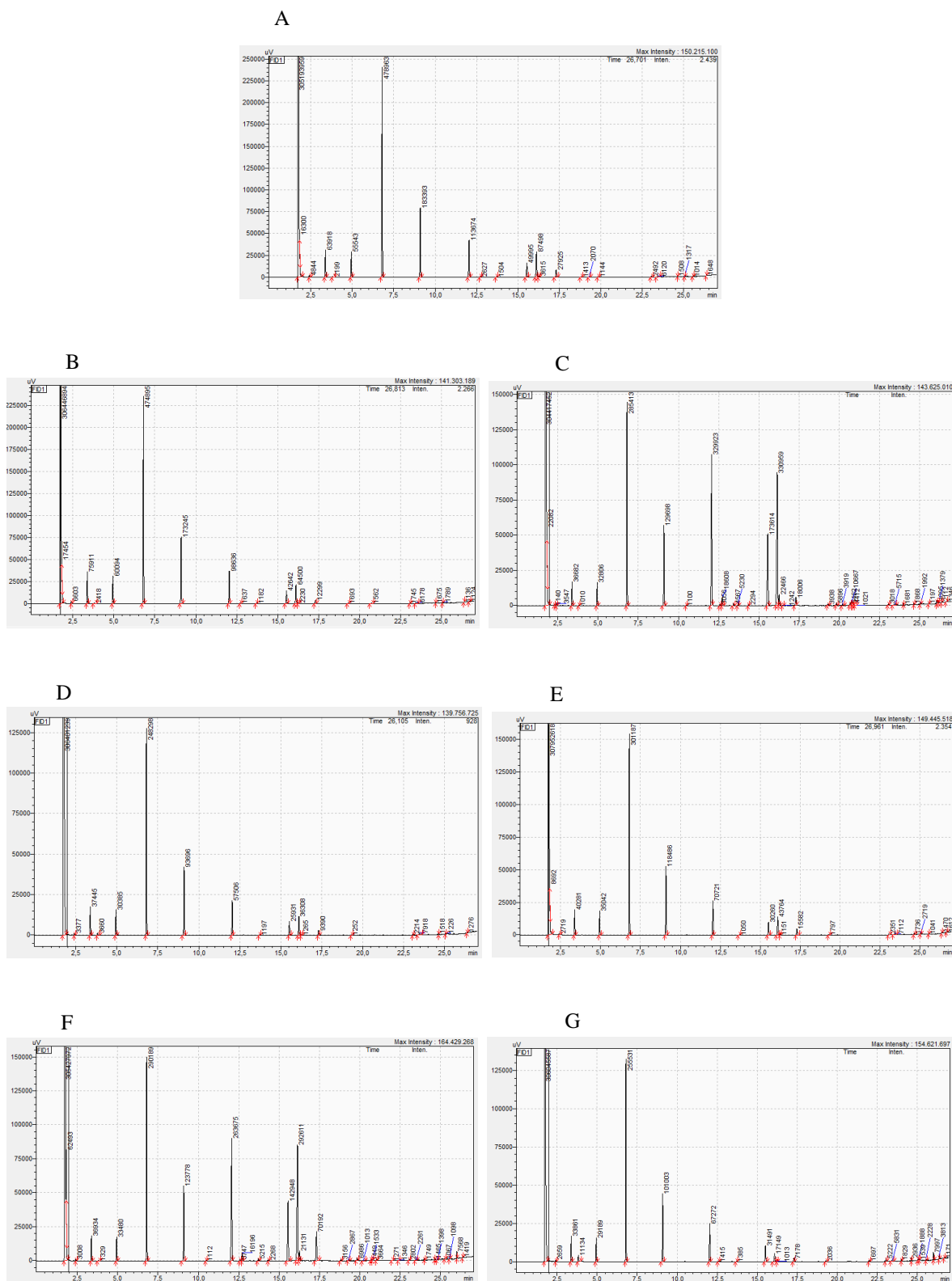


Figura 56- Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtido por GC-FID desta formulação original (A), utilizada na produção das soluções de stress deste estudo acelerado, e desta após indução de hidrólise básica (NaOH 0,1 M) nos dias 1 (B) e 4 (C), hidrólise ácida (HCl 0,1 M) nos dias 1 (D) e 4 (E) e oxidação (3 % H₂O₂) nos dias 1 (F) e 4 (G) de estudo.

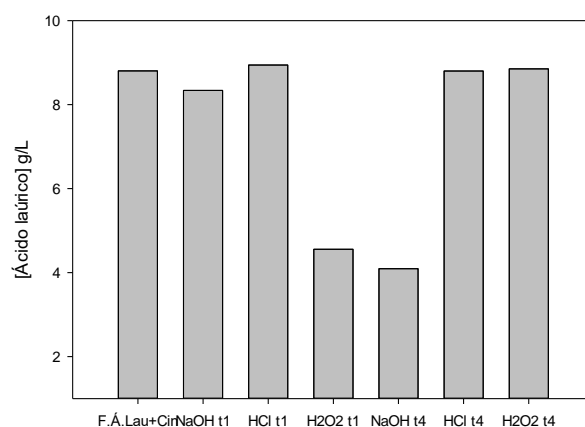


Figura 57- Valores da concentração de Ácido láurico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1 e 4 após indução de hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M) e oxidação (3 % H₂O₂).

Concluindo, verifica-se que as três formulações avaliadas são estáveis durante um mês, mesmo quando sujeitas a temperaturas elevadas, nas alturas de maior calor, aquando do seu armazenamento e transporte. Os valores de pH têm tendência para diminuir ao longo do tempo, no entanto em um mês esta diminuição demonstra não ser muito relevante. Em termos de aparência, esta mantém-se constante, durante um mês. Os valores de índice de peróxidos em ambas as formulações são sempre valores aceitáveis para nutrição animal durante um mês. Os iões Na⁺, K⁺ e Cl⁻ demonstram manter-se estáveis, sem ocorrer a sua precipitação às diferentes temperaturas estudadas. Ainda, a glucose também demonstra manter-se estável, com tendência para valores constantes, durante 15 dias, para as formulações de cinamaldeído e ambos os compostos. No entanto, existe uma tendência para a redução desta em solução ao longo do tempo, na formulação de ácido láurico. Esta redução deve-se ao desenvolvimento microbiológico nesta formulação. Em termos microbiológicos, os resultados negativos, para as formulações de cinamaldeído e ambos os compostos, reforçam o seu potencial antimicrobiano e garantem a sua estabilidade microbiológica, durante um mês. Na formulação de ácido láurico, verifica-se desenvolvimento de leveduras e bolores, principalmente a temperaturas de 25 °C, mas que poderá ser controlado com indicação de armazenamento desta a temperaturas mais baixas e transporte refrigerado, ou por esterilização do produto. Por fim, o ácido láurico demonstra ser estável às diferentes temperaturas estudadas, apesar de os resultados obtidos terem tendência para estar acima do esperado. Quanto aos estudos acelerados, parece existir uma indução de precipitação de iões K⁺ após indução de hidrólise ácida. Para além da influência destas condições de stress na

estabilidade dos iões, também se verificou uma influência na estabilidade da glucose. A hidrólise ácida, básica e a oxidação das várias formulações, podem promover a degradação ou transformação química da glucose em solução, justificando a ausência do pico característico desta e aparecimento de outros picos a tempos de retenção superiores por HPLC. Por fim, o ácido láurico, como ácido carboxílico, demonstra ser resistente a alterações induzidas por qualquer uma destas condições de stress estudadas, por ausência de redução drástica do pico característico deste por GC-FID. No entanto, dada a variabilidade dos resultados obtidos ao longo do tempo, uma repetição desta determinação seria importante, para as formulações de ácido láurico e de ácido láurico e cinamaldeído. Apesar de só se ter discutido a estabilidade do ácido láurico, como composto ativo do produto, verifica-se uma influência da temperatura no perfil lipídico das formulações contendo a emulsão de óleo de coco (**anexos 14 e 16**), tornando-se interessante uma posterior repetição desta análise com GC-MS, no sentido de se identificar compostos de degradação e vias de degradação. Para além disso, seria importante, posteriormente, determinar também a influência destas condições de stress na estabilidade do composto orgânico cinamaldeído, nas duas formulações contendo este. Para isto, será necessário desenvolver um método de extração deste composto destas soluções a diferentes temperaturas e contendo NaOH, HCl e H₂O₂, para posterior diluição em isooctano e injeção no GC-FID, possivelmente por decantação. Assim, os resultados demonstram que as três formulações são estáveis, durante um mês, mesmo quando sujeitas a temperaturas mais elevadas, com tendência para ausência de alterações na concentração dos seus constituintes, nem da sua aparência, estado de oxidação e pH. A estabilidade microbiológica destas também é garantida, durante um mês, com especial indicação de refrigeração, no caso da formulação de ácido láurico, prevenindo o desenvolvimento de fungos, unicelulares e pluricelulares, nestas.

Capítulo V- Conclusão e perspectivas futuras

A mortalidade dos leitões, após o desmame, é uma consequência da diarreia pós-desmame, com elevado impacto económico para a indústria suína. Esta doença é caracterizada pelo desenvolvimento de infeções bacterianas intestinais nestes animais, quando o seu sistema imunitário está débil e estes estão sujeitos a um elevado stress nutricional, ambiental e social. A solução deste problema é pertinente e carece do desenvolvimento de um produto não farmacológico, pressionado pelas entidades reguladoras. Esta pressão deve-se ao acrescido aumento de resistência a antibióticos pelas bactérias alojadas a nível intestinal nos animais e o perigo que isto acarreta para saúde pública, por contaminação da cadeia alimentar. Assim, torna-se importante desenvolver um produto que seja passível de controlo da DPD, mas ao mesmo tempo que não represente perigo para a saúde pública.

O desenvolvimento do produto Swine Sweet Health baseou-se na importância de atuar nas várias vertentes do problema, promovendo a formação de uma mistura completa, potenciando o seu carácter terapêutico, única, aceitável e estável. Esta consistiu numa fonte de energia para o animal, contrariando as baixas ingestões de líquidos e sólidos, e sais, como solução de reidratação oral, terapêutica para a diarreia. Para além disso, apresenta palatibilizantes, como a sacarina de sódio, prebióticos, mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos e compostos com propriedades antimicrobianas, o cinamaldeído e o ácido láurico, presente no óleo de coco. Foi, ainda, importante a preocupação com a incorporação de estabilizantes, como o citrato de sódio e o EDTA, em solução, prevenindo alterações indesejáveis ao longo do tempo de armazenamento, como a precipitação de iões em solução. Assim, foi possível obter três formulações do produto, com potencial no controlo da DPD nos leitões, após o desmame.

A comercialização deste produto carece de uma avaliação da sua aceitabilidade pelos animais e da sua estabilidade no laboratório da D.I.N. A realização de estudos de aceitabilidade preliminares é importante, de forma a descartar a possível rejeição, das formulações desenvolvidas do produto, pelos animais. Este estudo, para as três formulações do produto, demonstrou uma ausência de discrepância na aceitabilidade entre as diferentes formulações e em relação ao grupo controlo. No entanto, esta ausência de discrepância estatística ($p > 0.05$), demonstra que estes são tão aceitáveis quanto a água, pelos animais.

Tendo em conta que se tratam de formulações ácidas, esta ausência de rejeição é promissora. Mas por outro lado, não se verificou, *in vivo*, um impacto dos palatibilizantes utilizados nas formulações. Neste estudo, os três dias de administração das formulações foram caracterizados por baixa ingestão de líquidos e sólidos e reação dos animais, devido ao stress sentido por estes. Apesar das ingestões de líquidos terem sido, aproximadamente, metade das esperadas e para as quais as formulações do produto foram desenvolvidas, induzindo uma ideia de necessidade de reformulação destas, seria importante, após a confirmação de ausência de rejeição dos produtos, a realização de estudos de maior duração. Assim, avaliar-se-ia o efeito terapêutico destes no animal e a possibilidade de diferenciação das ingestões relativamente ao controlo, na altura em que o animal começa a reagir e até ao momento em que este se torna mais autossuficiente, em termos de resposta imunitária, por volta dos 5-7 dias após o desmame.

A análise físico-química e microbiológica das três formulações do produto ao longo de um mês, demonstrou resultados promissores, garantindo a estabilidade destas durante um mês de armazenamento. Esta estabilidade foi marcada pela tendência para ausência de alterações do pH e do grau de oxidação do produto, avaliado pelo índice de peróxidos, e nas quantidades dos seus constituintes, glucose, iões e/ou ácido láurico, em solução. A ausência de desenvolvimento microbiológico nas formulações de cinamaldeído e de ambos os compostos antimicrobianos, demonstra o potencial deste produto no combate ao desenvolvimento microbiológico e, mais especificamente, de *E. coli* patogénica. Apesar da formulação de ácido láurico ter demonstrado desenvolvimento fúngico, de bolores e leveduras, principalmente aos 25 °C, próximo da temperatura ótima de desenvolvimento destes, este pode ser controlado por indicação de conservação a temperaturas inferiores a esta. Apesar das três formulações terem reagido da mesma forma em termos de estabilidade nos restantes parâmetros, ao longo do tempo, esta discrepância de estabilidade microbiológica, suscita a hipótese de maior poder antibacteriano do cinamaldeído em relação ao ácido láurico. Desta forma, apesar de o cinamaldeído ser um composto mais caro, graças à existência de processos de extração subjacentes à sua obtenção, a sua inclusão na formulação final do produto demonstra ser vantajosa. A decisão da sua adição na mistura final, implica uma avaliação *in vivo* mais prolongada deste produto, tal como sugerido anteriormente, uma vez que o cinamaldeído é caracterizado por propriedades organolépticas únicas, que possam ser preponderantes na diferenciação das ingestões das diferentes

formulações neste estudo. Por outro lado, a presença de contaminação pode ter sido devida apenas a um problema de assepsia na preparação desta solução, podendo ser ultrapassada utilizando procedimentos apropriados, como a esterilização após embalagem. Para este produto em específico, como produto ácido, apesar de apresentar elevada atividade de água, um investimento em pasteurização não será viável. Isto implicaria um investimento elevado pela D.I.N., S.A, não preparada para comercialização de produtos líquidos, apenas de sólidos para nutrição animal. No entanto, caso continuem a investir na inovação de produtos líquidos, sem características específicas promotoras da estabilidade físico-química e microbiológica destes, a pasteurização será um aspeto a considerar na garantia da sua estabilidade. Para além do prolongamento dos estudos in vivo, após a confirmação de estabilidade de um mês destas formulações, é importante a sua continuidade até, pelo menos, os 6 meses, segundo a legislação nacional e europeia. Assim, verificam-se resultados promissores, com ausência de rejeição das três formulações do produto pelos leitões, nos três dias após o desmame, e garantia da sua estabilidade durante um mês, com refrigeração, no caso da formulação de ácido láurico.

Os estudos de estabilidade acelerados também são importantes no desenvolvimento de um produto, uma vez que elucidam alterações nos seus constituintes, possíveis compostos de degradação resultantes e vias de degradação envolvidas. Os estudos das três formulações na presença de NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M e 3 % de H₂O₂, demonstram algumas evidências da precipitação de iões K⁺, na presença de HCl. Para além da alteração na estabilidade dos iões em solução, verifica-se uma indução da degradação da glucose ou a sua transformação em produtos resultantes do seu metabolismo nestas condições, como epimerização, isomerização, dimerização, glicosilação e oxidação desta. Por último, o ácido láurico parece demonstrar resistência a alterações induzidas por estas condições de stress em solução, tal como esperado uma vez que se trata de um ácido carboxílico, geralmente, mais resistente nestas condições. Assim, verifica-se uma influência da hidrólise ácida e básica e da oxidação das três formulações na estabilidade dos seus vários constituintes, exceto do ácido láurico. Posteriormente, seria interessante a repetição destes estudos, com análise por GC-MS e HPLC-MS, promovendo o conhecimento dos compostos formados após hidrólise ácida e básica e oxidação induzidas nas formulações, como os compostos orgânicos resultantes da degradação da glucose e destabilização do perfil lipídico em solução.

Concluindo, com a realização destes estudos foi possível verificar se as três formulações do produto a desenvolver são aceitáveis, pelos animais, e como variava a sua estabilidade, ao longo do tempo, sob diferentes condições. Nestes estudos, comprovou-se a ausência de rejeição dos produtos pelos leitões, nesta fase específica do seu desenvolvimento, e garantia da sua estabilidade, durante um mês. Assim, caso seja comprovado o seu efeito terapêutico *in vivo* e a sua estabilidade de 6 meses, segundo a legislação nacional e europeia, com o prolongamento destes estudos, o produto poderá ser comercializado pela D.I.N, S.A. Após a sua comercialização, espera-se uma elevada procura por este, pelo menos em Portugal, uma vez que se insere num segmento de mercado pouco explorado por empresas nacionais de nutrição animal. Em Portugal, existe a comercialização de rações sólidas, enriquecidas com aditivos, como compostos antimicrobianos, mistura ácida em pó, vitaminas e minerais, mas ausência de produtos líquidos com este fim. Este produto líquido torna-se mais adequado, comparativamente aos sólidos, uma vez que a sua forma física facilita as ingestões destes princípios ativos, no controlo da DPD, pelos animais, facilitando a transição do leite para a ração sólida por estes.

Capítulo VI- Referências Bibliográficas

- 1- Amezcua E, Friendship RM, Dewey CE, Gyles C, Fairbrother JM. Presentation of postweaning *E.coli* diarrhea in southern Ontario prevalence of hemolytic *E.coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can J Vet Res.* 66, 73-8 (2002)
- 2- Jensen, P. Observations of the maternal behavior on the free-ranging domestic pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 16, 131–142 (1986)
- 3- Lallès, J.P. et al. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 260–268 (2007)
- 4- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *E.coli* in Postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev.* 6, 17-39 (2005)
- 5- Hampson, D. J. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science* 40, 32–40 (1986)
- 6- Williams, I. H. Growth of the weaned pig. In: J. R. Pluske, J. V. Le Dividich, M. W. A. Verstegen (eds), *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 17–36 (2003)
- 7- Lalles, J. P.; Boudry, G.; Favier, C.; Le Floch, N.; Lurona, I.; Montagne, L.; Oswald, I. P.; Pie, S.; Piel, C.; Seve, B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* 53, 301–316 (2004)
- 8- Wilson, R. H.; Leibholz, J. Digestion in the pig between 7 d and 35 d of age. II. The digestion of dry matter and the pH of digesta in pigs given milk and soybean proteins. *British Journal of Nutrition* 45, 321–336 (1981)
- 9- Cranwell, P. D. Development of the neonatal gut and enzyme systems. In: M. A. Varley (ed.), *The Neonatal Pig: Development and Survival*. CAB International, Wallingford, pp. 99–154 (1995)
- 10- Amezcua R, Friendship R, Dewey C, Gyles C. A case-control study investigating risk factors associated with postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern, Ontario. *Journal of Swine Health and Production* 10, 245–249 (2002)
- 11- Blecha F, Pollmann DS, Nichols DA. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *Journal of Animal Science* 56, 396–400 (1983)
- 12- Watrang E, Wallgren P, Lindberg A, Fossum C. Signs of infections and reduced immune functions at weaning of conventionally reared and specific pathogen free pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health* 45, 7–17 (1998)
- 13- Cranwell, P. D. The development of acid and pepsin (Ec-3.4.23.1) secretory capacity in the pig – the effects of age and weaning 1. Studies in anesthetized pigs. *British Journal of Nutrition* 54, 305–320 (1985)
- 14- Jensen, M. S.; Jensen, S. K.; Jakobsen, K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *Journal of Animal Science* 75, 437–445 (1997)
- 15- Kelly, D.; Smyth, J. A.; McCracken, K. J. Digestive development of the early-weaned pig. II, Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *British Journal of Nutrition* 65, 181–188 (1991b)
- 16- McCracken, B. A.; Spurlock, M. E.; Roos, M. A.; Zuckermann, F. A.; Gaskins, H. R. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition* 129, 613–619 (1999)
- 17- Pie, S.; Lallès, J. P.; Blazy, F.; Laffitte, J.; Seve, B.; Oswald, I. P. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of Nutrition* 134, 641–647 (2004)

- 18- Hedemann, M. S.; Højsgaard, S.; Jensen, B. B. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87, 32–41 (2003)
- 19- Wapnir, R. A.; Teichberg, S. Regulation mechanisms of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 190–199 (2002)
- 20- Williams, B. A.; Verstegen, M. W. A.; Tamminga, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews* 14, 207–227 (2001)
- 21- Boudry, G.; Peron, V.; Le Huerou-Luron, I.; Lalles, J. P.; Seve, B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition* 134, 2256–2262 (2004b)
- 22- Bikker P, Dirkwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huerou- Luron I, Lalles JP, et al. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *Journal of Animal Science* 84, 3337–45 (2006)
- 23- Franklin, M. A.; Mathew, A. G.; Vickers, J. R.; Clift, R. A. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *Journal of Animal Science* 80, 2904–2910 (2002)
- 24- Ha SK, Choi C and Chae C. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation* 15, 378–381 (2003)
- 25- Alexa P, Stouracova K, Hamrik J and Rychlik I. Gene typing of the colonisation factor K88 (F4) in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets. *Veterinary Medicine Czech* 46, 46–49 (2001)
- 26- Smeds A, Pertovaara M, Timonen T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, Palva A. Mapping the binding domain of the F18 fimbrial adhesin. *Infect Immun.* 71, 2163-2172 (2003)
- 27- Thiagarajah JR and Verkman AS. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. *Current Opinion in Pharmacology* 3, 594–599. (2003)
- 28- J and Richardson SH. Activation of adenylate cyclase by heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity similar to that of cholera toxin. *Journal of Clinical Investigation* 62, 281–285 (1978)
- 29- Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for endothelial integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11110-11114 (1991)
- 30- Guttman J, et al. Aquaporins contribute to diarrhea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 9, 131-141 (2007)
- 31- Horstman AL, Bauman SJ and Kuehn MJ. Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. *Journal of Biological Chemistry* 279, 8070–8075 (2004)
- 32- Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH and Corbin JD. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *American Journal of Physiology* 263, C607–C615 (1992)
- 33- Zajacova ZS, Faldyna M, Kulich P, Kummer V, Maskova J, Alexa P. Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Escherichia coli* strains positive for EAST1 and AIDA. *Vet Immunol Immunopathol.* 152, 176–82 (2013)
- 34- Harville BA and Dreyfus LA. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E₂ in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infection and Immunity* 63, 745–750 (1995)
- 35- Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* (2016)
- 36- Mullaney CD, Francis DH, Willgoos JA. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88 and 987P pilus antigens of *E. coli*. *J Vet Diagn Invest* 3, 115-118 (1991)

- 37- Castillo, M.; Martı̄n-Orūe, S. M.; Manzanilla, E. G.; Badiola, I.; Martı̄n, M.; Gasa, J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 114, 165–170 (2006)
- 38- Tiels P, Verdonck F, Coddens A, Goddeeris B, Cox E. The excretion of F18+ *E. coli* is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate. *Vaccine*. 26, 2154–63 (2008)
- 39- Fuentes M, Pijoan C, Becton L, Morrison B and Pieters M. Inoculation of nonpathogenic *Escherichia coli* to control disease and reduce antibiotic usage. In: *Proceedings of the 18th Congress IPVS*, Hamburg, Germany, 18, 258 (2004)
- 40- PEREIRA, D.A. et al. Humoral immune response of immunized sows with recombinant proteins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *World Journal of Vaccines*. 5, 60-68 (2015a)
- 41- Kolotilin, I., Kaldis, A., Devriendt, B., Joensuu, J., Cox, E. Menassa, R. (2012) Production of a subunit vaccine candidate against porcine post-weaning diarrhea in high-biomass transplastomic Tobacco. *PLoS ONE*. 7, 8 (2012)
- 42- Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, et al. Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *J Antimicrob Chemother*. 8, 23,6–13 (2016)
- 43- Barton MD Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews* 13, 279–299 (2000)
- 44- DGS B. Antimicrobial Drug use in swine. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5, 553–68 (2013)
- 45- Prescott JF. Beta-lactam Antibiotics: Penam Penicillins. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5, 135–52 (2013)
- 46- Dowling PM. Aminoglycosides and Aminocyclitols. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5, 233–56 (2013)
- 47- Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents*. 48(2), 119–26 (2016)
- 48- Castro M Use of additives on the feeding of monogastric animals. *Cuban Journal of Agricultural Science* 39, 439–445 (2005)
- 49- Bauer E, Williams BA, Smidt H, Mosenthin R & Verstegen MWA. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. *Nutrition Research Reviews* 19, 1–17 (2006)
- 50- Gibson, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition* 129, 1438–1441 (1999)
- 51- Gibson, G. R.; Wang, X. Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. *Food Microbiology* 11, 491–498 (1994a)
- 52- Bohacenko I, Pinkrova J, Peroutkova J, Pechackova M. Fermentation of lactose and lactulose mixture by *Lactobacillus acidophilus* strain (in Czech). *Chemicke Listy* 101, 911–915 (2007)
- 53- Molist, F., E. G. Manzanilla, J. F. Pérez, and C. M. Nyachoti. Coarse, but not finely ground, dietary fibre increases intestinal Firmicutes:Bacteroidetes ratio and reduces diarrhoea induced by experimental infection in piglets. *Br. J. Nutr.* 108, 9-15 (2012)
- 54- Lyons TP, Bourne S. Principles of the effect of probiotics on the basis of yeasts and mannans. In: Proceedings of Conference on Probiotics in animal nutrition, Pohorelice, *Czech Republic* 13–22 (1995)
- 55- Smiricky-Tjardes MR, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Fahey GC. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *Journal of Animal Science* 81, 2535–2545 (2003)
- 56- Zimmermann B, Bauer E, Mosenthin R. Pro- and prebiotics in pig nutrition – potential modulators of gut health? *Journal of Animal and Feed Sciences* 10, 47–56 (2001)
- 57- Loh G, Eberhard M, Brunner RM, Hennig U, Kuhla S, Kleessen B & Metges CC. Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *Journal of Nutrition* 136, 1198–1202 (2006)

- 58- Pierce KM, Sweeney T, Brophy PO, Callan JJ, Fitzpatrick E, McCarthy P & O'Doherty JV. The effect of lactose and inulin on intestinal morphology, selected microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the gastrointestinal tract of the weaned pig. *Animal Science* 82, 311–318 (2006)
- 59- Badia R, Zanello G, Chevaleyre C, Lizardo R, Meurens F, Martinez P, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and betagalactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Vet Res.* 43, 4 (2012)
- 60- Davis, M.E., Maxwell, C.V., Erf, G.F., Brown, D.C., Wistuba, T.J. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 1882-1891 (2004)
- 61- Estrada A, Drew MD, van Kessel A. Effect of the dietary supplementation of fructooligosaccharides and *Bifidobacterium longum* to early-weaned pigs on performance and fecal bacterial populations. *Canadian Journal of Animal Science* 81, 141–8 (2001)
- 62- Mikkelsen, L. L.; Jensen, B. B. Effect of fructooligosaccharides and transgalactooligosaccharides on microbial populations and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets post-weaning. *Animal Feed Science and Technology* 117, 107–119 (2004)
- 63- Shim SB, Williams BA, Verstegen MWA. Effects of dietary fruct-oligosaccharide on villous height and disaccharidase activity of the small intestine, pH, VFA and ammonia concentrations in the large intestine of weaned pigs. *Acta Agriculturae Scand Section A* 55, 91–7 (2005)
- 64- Schrezenmeir, J.; de Vrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 361–364 (2001)
- 65- Danek P, Novak J, Semerádová H, Diblíková E. The effect of probiotic *Lactobacillus casei* CCM4160 application to sows on piglet performance (in Czech). *Zivocisna Vyroba* 36, 411–415 (1991)
- 66- Demecková V, Kelly D, Coutts AGP, Brooks PH, Campbell A. The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrum quality of farrowing sows. *International Journal of Food Microbiology* 79, 85–97 (2002)
- 67- Setia A, Bhandari SK, House JD, Nyachoti CM, Krause DO. Development and *in vitro* evaluation of an *Escherichia coli* probiotic able to inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science* 87, 2005–2012 (2009)
- 68- Jadamus A, Vahjen W, Simon O. Growth behavior of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Archives of Animal Breeding* 54, 1–17 (2001)
- 69- Lodemann U, Lorenz BM, Weyrauch KD, Martens H. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Archives of Animal Nutrition* 62, 87–106 (2008)
- 70- Schoroeder B, Duncker S, Barth S, Bauerfeind R, Gruber AD, Deppenmeier S *et al.* Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection. *Dig Dis Sci.* 51, 724-731 (2006)
- 71- Ushe TC, Nagy B. Inhibition of small intestinal colonization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by *Streptococcus faecium* M74 in pigs. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, Serie B Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Präventive Medizin* 181, 374–382 (1985)
- 72- Alexopoulos C, Karagiannidis SK, Kritas SK, Boscós C, Georgoulakis IE, Kyriakis SC. Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. *Journal of Veterinary Medical Science* 48, 137–145 (2001)
- 73- Martelli P. Nutritional and sanitary effects of *Bacillus subtilis* use as feed additive in pigs. *Rivista-di- Suinicoltura* 33, 35–39 (1992)
- 74- Bontempo, V.; Di Giancamillo, A.; Savoini, G.; Dell'Orto, V.; Domeneghini, C. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed Science and Technology* 129, 224–236 (2006)

- 75- Trekova M, Faldyna M, Alexa P, Sramkova Zajacova Z, Gopfert E, Kumprechtova D, et al. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *J Anim Sci.* 92, 767–74 (2014)
- 76- Adami A, Cavazzoni V. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *Journal of Basic Microbiology* 39, 3–9 (1999)
- 77- Link R, Kovac G. The effect of probiotic BioPlus 2B on feed efficiency and metabolic parameters in swine. *Biologia* 61, 783–787 (2006)
- 78- Rogelj I, Bogovic Matijas ic B. Lactobacillus gasseri LF221 and K7-from isolation to application. *Biologia* 61, 761–9 (2006)
- 79- Konstantinov SR. From composition to functionality of the porcine intestinal microbiota. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands (2005)
- 80- Jin, L. Z.; Marquardt, R. R.; Zhao, X. A strain of enterococcus faecium (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4200–4204 (2000)
- 81- Blomberg, L.; Henriksson, A.; Conway, P. L. Inhibition of adhesion of Escherichia coli K88 to piglet ileal mucus by Lactobacillus spp. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 34–39 (1993)
- 82- Daudelin JF, Lessard M, Beaudoin F, Nadeau E, Bissonnette N, Boutin Y, et al. Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Vet Res.* 42, 69–80 (2011)
- 83- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N. Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science* 78, 1597–1606 (1995)
- 84- Shu, Q.; Qu, F.; Gill, H. S. Probiotic treatment using bifidobacterium lactis HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and Escherichia coli infection in a piglet model. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 33, 171–177 (2001)
- 85- Duncker, S.C., Lorentz, A., Schroeder, B., Breves, G., Bischoff, S.C. Effect of orally administered probiotic E.coli strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 239-250 (2006)
- 86- Broom, L.J., Miller, H.M., Kerr, K.G., Knapp, J.S. Effects of zinc oxide and Enterococcus faecium SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res Vet. Sci.* 80, 45-54 (2006)
- 87- Roselli, M.; Finamore, A.; Britti, M. S.; Mengheri, E. Probiotic bacteria bifidobacterium animalis MB5 and lactobacillus rhamnosus GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation -associated response induced by enterotoxigenic Escherichia coli K88. *British Journal of Nutrition* 95, 1177–1184 (2006)
- 88- Bo¨ hmer BM, Kramer W, Roth-Maier DA. Dietary probiotics supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90, 309–15 (2006)
- 89- Newbold CJ, Wallace RJ, Chen XB, McIntosh FM. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *Journal of Animal Science* 73, 1811–1818 (1995)
- 90- Park DY, Namkung H, Paik IK. Effects of supplementary enzymes or probiotics on the performance and ammonia gas production in weanling pigs. *Korean Journal of Animal* (2001)
- 91- Krumbeck JA, Maldonado-Gomez MX, Martinez I, Frese SA, Burkey TE, Rasineni K, et al. In vivo selection to identify bacterial strains with enhanced ecological performance in synbiotic applications. *Appl Environ Microbiol.* 81, 2455–65 (2015)
- 92- Bomba A, Nemcova R, Gancarcikova S, Herich R, Guba P, Mudronova D. Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated acids. *British Journal of Nutrition* 88, 95–99 (2002)
- 93- Piva A, Casadei G, Gatta PP, Luchansky JB, Biagi G. Effect of lactitol, lactic acid bacteria, or their combinations (synbiotic) on intestinal proteolysis *in vitro*, and on feed efficiency in weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 85, 345–353 (2005)

- 94- Nemcova R, Bomba A, Gancarcikova S, Heich R, Guba P. Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructooligosacharides on the faecal microflora in weanling piglets. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 112, 225–228 (1999)
- 95- Bird AR, Vuaran M, Crittenden R, Hayakawa T, Playne MJ, Brown IL, Topping DL. Comparative effects of a high-amylose starch and a fructooligosacharide on fecal bifidobacteria numbers and short-chain fatty acids in pigs fed *Bifidobacterium animalis*. *Digestive Diseases and Sciences* 54, 947–954 (2009)
- 96- Ravindran, V.; Kornegay, E. T. Acidification of weaner pig diets: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62, 313–322 (1993)
- 97- De Freitas LS, Lopes DC, De Freitas AF, Carneiro JDC, Corassa A, Pena SDM, Costa LF. Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days. *Brazilian Journal of Animal Science* 35, 1711–1719 (2006)
- 98- Tsioloyiannis, V. K.; Kyriakis, S. C.; Vlemmas, J.; Sarris, K. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science* 70, 287–293 (2001)
- 99- Eidelsburger U, Kirchgessner M, Roth FX. Influence of fumaric acid, hydrochloric acid, sodium formate, tylosin and tyocerin on daily weight gain, feed intake, feed conversion rate and digestibility. 11. Investigations about the nutritive efficacy of organic acids in the rearing of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 68, 82–92 (1992)
- 100- Hansen CF, Riis AL, Bresson S, Hojbjerg O, Jensen BB. Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science* 108, 206–209 (2007)
- 101- Russell JB, Diez-Gonzalez F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology* 39, 206–34 (1998)
- 102- Ferrara F, Tedin L, Pieper R, Meyer W, Zentek J. Influence of mediumchain fatty acids and short-chain organic acids on jejunal morphology and intra-epithelial immune cells in weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 101, 531–40 (2017)
- 103- Kirchgessner M, Roth FX, Paulicks BR. Nutritive efficacy of sorbic acid in the rearing of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 74, 235–242 (1995)
- 104- Knarreborg A, Miquel N, Granli T, Jensen BB. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology* 99, 131–40 (2002)
- 105- Taube, V. A.; Neu, M. E.; Hassan, Y.; Verspohl, J.; Beyerbach, M.; Kamphues, J. Effects of dietary additives (potassium diformate/organic acids) as well as influences of grinding intensity (coarse/fine) of diets for weaned piglets experimentally infected with Salmonella Derby or Escherichia coli. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93, 350–358 (2009)
- 106- Overland M, Kjos NP, Borg M, Skjerve E, Sorum H. Organic acids in diets for entire male pigs: effect on skatole level, microbiota in digesta, and growth performance. *Livestock Science* 115, 169–178 (2008)
- 107- Owusu-Asiedu, A.; Nyachoti, C. M.; Marquardt, R. R. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic Escherichia coli (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *Journal of Animal Science* 81, 1790–1798 (2003b)
- 108- Partanen K, Siljander-Rasi H, Alaviuhkola T, Suomi K, Fossi M. Performance of growing-finishing pigs fed medium or high fibre diets supplemented with avilamycin, formic acid or formic acid-sorbate blend. *Livestock Production Science* 73, 139–152 (2002)
- 109- Giesting, D. W.; Easter, R. A. Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs. *Journal of Animal Science* 69, 2497–2503 (1991)

- 110- Jensen-Waern M, Melin L, Lindberg R, Johannisson A, Petersson L, Wallgren P. Dietary zinc oxide in weaned pigs – effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. *Research in Veterinary Science* 64, 225–231 (1998)
- 111- Li XL, Yin JD, Li DF, Chen XJ, Zang JJ, Zhou X. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *Journal of Nutrition* 136, 1786–1791 (2006)
- 112- Mores N, Cristani J, Piffer IA, Barioni W, Lima GMM. Effects of zinc oxide on postweaning diarrhea control in pigs experimentally infected with *E. coli*. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria, E Zootecnia* 50, 513–523 (1998)
- 113- Roselli, M., Finamore, A., Garaguso, I., Britti, M.S., Mengheri, E. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. *J. Nutr.* 133,4077-4082 (2003)
- 114- Carlson, D.; Sehested, J.; Poulsen, H. D. Zinc reduces the electrophysiological responses in vitro to basolateral receptor mediated secretagogues in piglet small intestinal epithelium. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology* 144, 514–519 (2006)
- 115- Han YK, Thacker PA. Performance, nutrient digestibility and nutrient balance in weaned pigs fed diets supplemented with antibiotics or zinc oxide. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 868–875 (2009)
- 116- Holman DB, Chénier MR. Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. *Can J Microbiol.* 61, 785–98 (2015)
- 117- Bouwhuis MA, Sweeney T, Mukhopadhyaya A, Thornton K, McAlpine PO, O’Doherty JV. Zinc methionine and laminarin have growth-enhancing properties in newly weaned pigs influencing both intestinal health and diarrhoea occurrence. *J Anim Physiol Anim Nutr* (Berl) (2016)
- 118- Bosi, P., Casini, L., Finamore, A., Cremokolini, C., Merialdi, G., Trevisi, P., Nobili, F., Mengheri, E. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 82, 1764-1772 (2004)
- 119- Xiao H, Shao F, Wu M, Ren W, Xiong X, Tan B, et al. The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *J Anim Sci Biotechnol.*6, 1–6 (2015)
- 120- Domeneghini C, D. G. A., Savoini G, Paratte R, Bontempo V, Dell’Orto V. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. *Histol. Histopathol.* 19, 49-58 (2004)
- 121- Tactacan GB, Cho SY, Cho JH, Kim IH. Performance responses, nutrient digestibility, blood characteristics, and measures of gastrointestinal health in weanling pigs fed protease enzyme. *Asian Australas J Anim Sci.* 29, 998–1003 (2016)
- 122- Mynott TL, Luke RK and Chandler DS. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic *Escherichia coli* receptor activity in piglet small intestine. *Gut* 38, 28–32 (1996)
- 123- Costa LB, Panhoza Tse ML, Miyada VS. Herbal extracts as alternatives to antimicrobial growth for weanling pigs. *Brazilian Journal of Animal Science* 36, 589–595 (2007)
- 124- Azaz AD, Irtem HA, Kurkcuoglu M, Baser KHC. Composition and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of some Thymus species. *Journal of Biosciences* 59, 75–80 (2004)
- 125- Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Blazevic N. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharmaceutica* 55, 417–422 (2005)
- 126- Kolacz R, Korniewicz A, Dobranski Z, Korniewicz D, Trziszka T. Effects of dietary halloisite on the performance and meat quality of pigs. *Medycyna Weterynaryjna* 61, 1266–1269 (2005)
- 127- Trckova M, Vondruskova H, Zraly Z, Alexa P, Hamrik J, Kummer V, Maskova J, Mrlik V, Krizova K, Slana I, Leva L, Pavlik I. The effect of kaolin feeding on efficiency, health status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in weaned piglets. *Veterinarni Medicina* 54, 47–63 (2009)

- 128- Hu CH, Xia MS. Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K-88. *Applied Clay Science* 31, 180–184 (2006)
- 129- Martinez M, Castro M, Hidalgo K, Ayala U, Perez R, Hernandez L, Baez L. Effective utilization of natural zeolite for diarrhea control. *Cuban Journal of Agricultural Science* 38, 387–390 (2004)
- 130- Lee CY, Kim SJ, Park BC, Han JH. Effects of dietary supplementation of bacteriophages against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 on clinical symptoms of post-weaning pigs challenged with the ETEC pathogen. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* (2016)
- 131- Chernysheva LV, Friendship RM, Gyles CL, Dewey CE. Field trial assessment of the efficacy of specific egg-yolk antibody product for control of postweaning *E. coli* diarrhea. *Vet Ther.* 4, 279–84 (2003)
- 132- Moran, A. W., M. A. Al-Rammahi, D. K. Arora, D. J. Batchelor, E. A. Coulter, K. Daly, C. Ionescu, D. Bravo, and S. P. Shirazi-Beechey. Expression of Na⁺/glucose co-transporter 1 (SGLT1) is enhanced by supplementation of the diet of weaning piglets with artificial sweeteners. *Br. J. Nutr.* 104, 637–646 (2010a)
- 133- Hirschhorn, N., and W. B. Greenough III. Progress in oral rehydration therapy. *Sci. Am.* 264, 50–56 (1991)
- 134- David González and J. Ignacio Fernández, MyA, Pinaluba Group. Use of exogenous amylase in early weaned piglets – an update on its importance. *Spain., International Pig Topics* 26, 5
- 135- Arne Korsbak, Market Development Manager, Feed Enzymes and Rene Bonekamp. Opening up the potential of pig feed with the use of enzymes. *Swine Specialist EMEA, DSM, International Pig Topics* 30, 7
- 136- CVMP. Development pharmaceuticals for veterinary medicinal products (EMA/CVMP/315/98) (1999)
- 137- 137VICH Topic GL2. Guideline on validation of analytical procedures: methodology (CVMP/VICH/591/98) (1998)
- 138- Lokesh B, et al. Excipients: Background/Introduction”. In: Ashok K and Mahesh C (eds). *Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems. Informa Healthcare, New York* (2006)
- 139- VICH Topic GL3. Guideline on stability: Stability testing of new veterinary drug substances and medicinal products (EMA/CVMP/VICH/899/99) (2007)
- 140- CVMP. Excipients in the dossier for application for marketing authorization for veterinary medicinal products (EMA/CVMP/004/98)
- 141- CPMP/CVMP. Guidance on inclusion of antioxidants and antimicrobial preservatives in medicinal products (CPMP/CVMP/QWP/115/95) (1997)
- 142- CPMP. Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products (EMA/CVMP/QWP/846/99) (2007)
- 143- ICH Topic Q1B. Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products (CPMP/ICH/279/95) (2006)
- 144- ICH Topic Q1A. Stability Testing of new Drug Substances and Products (CPMP/ICH/2736/99) (2006)
- 145- CHMP, CVMP. Guideline on plastic immediate packaging materials (EMA/CVMP/205/04) (2005)
- 146- VICH Topic GL11. Guideline on impurities in new veterinary medicinal products (EMA/CVMP/VICH/838/99) (2007)
- 147- Rukmini, A., 2Raharjo, S., 2Hastuti, P. and 2Supriyadi, S. Formulation and stability of water-in-virgin coconut oil microemulsion using ternary food grade nonionic surfactants. *International Food Research Journal* 19(1): 259-264 (2012)
- 148- WHO Guidelines for drinking-water quality - 4th edição, 2:25-31 (2011)
- 149- Chaleepa K., Szepes A., Ulrich J. Effect of additives on isothermal crystallization kinetics and physical characteristics of coconut oil, *Chemistry and Physics of Lipids*, 163, 4–5:390-396 (2010)

- 150- Paul D.I. Fletcher *, Jane S. Morris Turbidity of oil-in-water microemulsion droplets stabilised by nonionic surfactants. *Colloids and Surfaces SURFACES Physicochemical and Engineering* 98: 147-154 (1995)
- 151- D.BMacdougall. Colour Measurement. Principles, Advances and Industrial Applications Woodhead Publishing Series in Textiles, 13: 312-342 (2010)
- 152- ISO 3960, Animal and vegetable fats and oils – Determination of peroxide value- Iodometric (visual) endpoint determination. 5ª edição (2007)
- 153- ISO 6869 Animal feeding stuffs - Determination of the contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc - Method using atomic absorption spectrometry (2000)
- 154- Norma NP 2972. Alimentos para animais. Determinação do teor de cloretos solúveis na água. Técnica de Charpentier-Volhard. 2ª edição (1994)
- 155- AOAC 14, 982. Glucose, Fructose, Sucrose and Maltose in PreSweetened cereals. Liquid Chromatographic Method. (1983)
- 156- ISSO 12966. Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. 1ª edição (2011)
- 157- ISSO 4833 Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Parte 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. 1ª edição (2013)
- 158- Validation EN ISO 16140 de la méthode RAPID'Enterobacteriaceae pour le dénombrement des entérobactéries en lectures manuelle et automatisée. Adria Developpement. (2014)
- 159- ISSO 16649 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli – Parte 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. 1ª edição (2001)
- 160- Validation of ISO 16140 of the RAPID'Salmonella method (short protocol and double enrichment). Adria Developpement. (2016)
- 161- Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Parte 1 Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. 1ª edição (2008)
- 162- EN ISO 6888 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Parte 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. 1ª edição (1999)
- 163- M.M. Chakrabarty, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF OILS AND FATS, Allied Publishers Pvt. Ltd (2003)
- 164- CSUROS Z., Soos R., FOGASSY E., SZABO G. T. and MOLK R. Y. STUDY ON THE CATALYTIC OXIDATION WITH AIR OF 1,2,0.iso.PROPYLIDENE-cc-D.GLUCOFURANOSE AND D-GLUCOSE. *Periodica Polyteehnica* 18,3 (1973)
- 165- MATHEWS A. P. THE SPONTANEOUS OXIDATION OF THE SUGARS. *Journal of Biological Chemistry* (1909)
- 166- GUANG WANG AND TONG WANG, Oxidative Stability of Egg and Soy Lecithin as Affected by Transition Metal Ions and pH in Emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 11424–11431 (2008)
- 167- Gabriel F. Branco, Maria I. Rodrigues, Luiz A. Gioielli, e Inar A. Castro, Effect of the Simultaneous Interaction among Ascorbic Acid, Iron and pH on the Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem.* 59, 12183–12192 (2011)
- 168- Gu Yi, Anna Haug, Nicole Frost Nyquist, Bjørg Egelanddal, Hydroperoxide formation in different lean meats, *Food Chemistry* 141, 2656–2665 (2013)
- 169- Virginie N. Kapchie †, Linxing Yao, Catherine C. Hauck, Tong Wang, Patricia A. Murphy, Oxidative stability of soybean oil in oleosomes as affected by pH and iron, *Food Chemistry*, 141 2286–2293(2013)
- 170- Yi-Ming Kuo, Role of sodium ions in the vitrification process: Glass matrix modification, slag structure depolymerization, and influence of metal immobilization, *Journal of the Air & Waste Management Association* , 64, 7 (2014)

171- Chandrani Chatterjee, Frances Pong e Ayusman Sen, Chemical Conversion Pathways for Carbohydrates, Green Chemistry

Capítulo VII- Anexos

Anexo 1 – Tabela com a descrição da composição e indicações de administração de vários exemplos de produtos disponíveis no mercado utilizados no controlo da DPD, utilizados como referências para a criação deste produto.

Tabela 1- Produtos existentes no mercado, utilizados no controlo da DPD.


Produto	Composição e Indicações
Enerlyte Plus	NaCl, KCl, Soro de leite em pó, Lactose, Bicarbonato de sódio, Dextrose (6,24 % Na ⁺ , 4,18 % Cl ⁻ e 2,11 % K ⁺) 2L de água
Tonistry Px	NaCl (7-8 %), KCl, glucose, ácido cítrico, glutamato monosódico, goma de xantana, fosfato monodódico, glicina, concentrado de proteína, ácido glutâmico
BlueLite 2Bw	Ácido cítrico, produto de fermentação de Enterococcus faecium, Bacillus licheniformis e Bacillus subtilis, tiosulfato de sódio, KCl, NaCl (2,75-3,75 %), Aluminato de sílica de sódio, glutamato monosódico, sacarose, frutose, glucose e corante azul; Na ⁺ (4,25-5,25 %), K ⁺ (5,10 %)
Doce & Doce Aditivo edulcorante	Sacarina de sódio (145 g/kg); Adicionar 25-30 g do produto em 1L de água, o que corresponde a 3,6-4,35 mg de sacarina de sódio/ L de água
HIDRAVET	Na ⁺ (182 g/kg), Cl ⁻ (340 g/kg), K ⁺ (66 g/kg), Mg ²⁺ (mínimo de 9 mg/kg) e Ca ²⁺ (5,0 -5,5 mg/kg). Para diluir 2 g de produto em 1L de água, correspondendo a 0.36 g de Na ⁺ , 0.68 g/L de Cl ⁻ e 0.13 g/L de K ⁺ por 1L de água
ELECTRIC ARÃO	Na ⁺ (182 g/kg), Cl ⁻ (273 g/kg), K ⁺ (660 mg/kg), Mg ²⁺ (9 g/kg), Ca ²⁺ (5-8 g/kg); Diluir 2,5 g de produto em 6ml de água, correspondendo a 75,83 g/L de Na ⁺ , 113,75 g/L de Cl ⁻ e 0,275 g/L de K ⁺
Gatorade	Garrafa de 591 mL, contendo água, dextrose (34 g), ácido cítrico, NaCl, fosfato de monopotássio, ácido fosfórico e corantes; Na ⁺ (270 mg), K ⁺ (75 mg). Administração direta, correspondendo a 0,46 g/L de Na ⁺ , 0,13 g/L de K ⁺ e 57,53 g/L de dextrose

Pedialyte advanced Care Plus	Embalagem de 273mL, contendo água e dextrose (4g). Menos de 1 % de: Galactooligosacarídeos, NaCl, ácido cítrico, citrato de K ⁺ , citrato de sódio, sucralose, acessulfame de K ⁺ , gluconato de zinco e corante azul; Na ⁺ (330 mg) e K ⁺ (180 mg). Administração de 1-2 L por dia, correspondendo a 1,21 g/L de Na ⁺ , 0,66 g/L de K ⁺ e 14,65 g/L de glucose.
Pedialyte Classic	Embalagem de 360mL, contendo água e dextrose (9 g). Menos de 2 % de: NaCl, ácido cítrico, citrato de K ⁺ , citrato de sódio, sucralose, acessulfame de K ⁺ , gluconato de zinco e corante amarelo; Na ⁺ (370 mg), Cl ⁻ (440 mg) e K ⁺ (280 mg). Administração de 1-2 L por dia, correspondendo a 1,03 g/L de Na ⁺ , 1,22 g/L de Cl ⁻ , 0,78 g/L de K ⁺ e 25,00 g/L de glucose.
Pedialye Powder Packs	Glucose, ácido cítrico, citrato de K ⁺ , NaCl, citrato de Na ⁺ . Menos de 2 % de: acessulfame de potássio, sucralose, corante vermelho e azul. Administrar 4-8 vezes por dia 9 g de produto em 273mL de água, correspondendo a 0,44 g/L de Na ⁺ , 0,54 g/L de Cl ⁻ , 0,33 g/L de K ⁺ e 11 g/L de glucose/dia.
Glucosal	Dextrose (82,5 %), Na ⁺ (5,1 %), Cl ⁻ (6,8 %), K ⁺ (0,5 %); CaCl (3 mg), NaCl (10 mg), KCl (10 mg), citrato de sódio (50 mg), dextrose (817 mg). Dissolver 15-30 g/L de água.
Enviva EO Swine	Em 100 g contem 4,5 g de cinamaldeído e 13.5 g de timol. Administrar 100 g por tonelada de ração, correspondendo a 4,5 g/tonelada de ração.
Biotronic Top3	Ácido orgânicos (200 g de ácido fórmico, 100 g de ácido acético e 50 g de ácido propiónico), cinamaldeído e complexo de permeabilização (ACPC). Saco de 25 kg. Administrar 1-1.5 kg/tonelada de alimento.
Biotronic SE	Ácido fórmico > 20 %, Ácido propiónico > 5%. Dissolver 440 g/litro. Administrar 31 litros/1000 litros de água ou 5litros/tonelada de ração.
ProHacid Classic	Ácido fórmico e láctico. Administrar 3-4 kg/tonelada de ração.
ProHacid Advance	6 diferentes ácido orgânicos, incluindo os ácidos sórbico e benzoico
CinergyTM	Óleos essenciais. Efeito promotor do crescimento e imunoestimulador.


Acidmix	15 g ácido acético, 7,5 g de ácido cítrico. Administração de 2 mL em 1 L de água.
BiopH (Hard Water)	Ácidos acético (1-4 %), fórmico (50-60 %) e propiônico (0.5-1.5 %), sulfato de cobre (<1 %), cloretos (2-5 %), com pH de 2,5-3,5. Administrar diluindo em água para um pH entre 3,7 e 4.
Easy Acid	Ácidos acético (10-25 %) e fórmico (25-50 %). Diluir 1/1000 em água, até pH 3,7-4,3.
Acid.Pak4-way Liquid Hard Water	Ácidos cítrico e acético, citrato de sódio, NaCl, KCl, Sulfatos de zinco, ferro e magnésio, extratos de Bacillus e Aspergillus e água; K (mínimo 0,65 %) e NaCl (3-4 %). Diluir 2 ml em 1 L de água e administrar durante 5-7 dias após o desmame.
ProPhorce PH 902 liquid	Ácidos fórmico, propiônico e láctico, óleos essenciais e sais de ácido fórmico. Administrar 1-2 g/1 L de água.
ProPhorce PH 502	Ácidos fórmico (20-30 %), láctico (15-25 %) e propiônico (2-7 %), formato de sódio (10-20 %) e cinamaldeído (1-5 %). Diluir 1mL em 1L de água de bebida.
Tetracid 500	Ácidos cítrico (10 %), fumárico (20 %), málico (10 %) e ortofosfórico (10 %). Administrar 2 kg/tonelada de alimento.
DaaCare (20 kg)	Ácidos fórmico (85 %), acético (80 %), propiônico (99,5 %), cítrico, benzoico e sórbico, formato de amônio, ácidos gordos (ácidos caprílico, cáprico e láurico), glicerina. Administrar 2 kg/tonelada de alimento seco.
Daafit	Ácido láurico e monolaurato de glicerol (GML90)
Daafit Plus	Ácido láurico, monolaurato de glicerol (GML90) e ácido benzoico
DaaLF	Ácidos sórbico, fórmico, acético e propiônico e formato de amônio
Daafit Aqua	Ácido láurico, monolaurato de glicerol (GML90) e ácido butírico
Daasal	Ácidos sórbico, acético, fórmico e propiônico e formato de amônio
Daaquasafe	Ácidos orgânicos de cadeia curta com cobre e zinco

Spray dried sweetener	98 % de Sacarina de sódio, ciclamato de sódio e NHDC. Administrar 50-75 g/tonelada de ração
Acidal ML	Ácidos propiónico, acético, fórmico, cítrico, fumárico e ortofosfórico, extrato de orégão, agentes emulsificantes e água. Diluir 1 mL em 1 L de água para obter um pH de 4.
Agrocid Super Oligo	Ácidos cítrico monoidratado (1-5 %), fórmico (35-50 %), propiónico (15-30 %), láctico (5-15 %) e sórbico, ZnCl, Cu ₂ (OH) ₃ Cl, açúcar, NaCl, quelante de cobre e zinco. Adicionar 300-500 ml por 1000 L de água, ou ajustes desta diluição para um pH final próximo de 4.
Nutrilac Plus	Ácidos orgânicos, como o fórmico e o láctico, imunoglobulinas, 50 % de lactose, palatabilizante, 20,5 % de proteína e 12 % de gordura. Dissolver 150 g/L de água a 45°C.
ADMIX 30	30 % butirato de sódio
ULTRACID P4 Dry	Ácidos fórmico, acético, propiónico, láctico e cítrico. Administrar 3-5 kg/tonelada
Vigorol (250 mL)	Ácidos caproico, caprílico, láurico (50g), mirístico, palmítico, oleico, linoleico e linolénico. Administração de 3-6 mL, correspondendo a 0.6-1.2 g de ácido láurico.

Anexo 2 – Ficha técnica do produto Swine Sweet Health e as duas propostas de rótulo do produto Swine Sweet Health.



A nossa experiência, a sua eficiência



ALIMENTOS COMPLEMENTARES PARA SUÍNOS

SWINE SWEET HEALTH
Alimento Complementar Para Leitões

Descrição	Solução oral ácida e doce, como fonte de energia rápida para os leitões e prevenção do desenvolvimento de distúrbios intestinais nestes.
Modo de Emprego	Administração de 0,5L por dia aos leitões, durante 5-7 dias, após o desmame.
Composição	Dextrose XOS Sais Extratos de óleos naturais* Mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos
	*As três formulações diferenciam-se na presença e/ou ausência de diferentes extratos de óleos naturais, com propriedades antimicrobianas.
Substâncias Indesejáveis	Cumprir com a legislação aplicável.
Embalagem	Embalagem opaca, segundo os requisitos necessários para conservação de produto líquido para alimentação animal. Peso Líquido: 1L.
Condições de Armazenagem	Armazenar em local seco e fresco.
Condições Especiais para Manuseamento, Preparação e Utilização	Evitar exposição solar direta. Agitar e manter à temperatura ambiente antes da administração.
Prazo de Validade	Pelo menos um mês. Necessária a continuidade dos estudos de estabilidade.

Documento em suporte informático. Qualquer impressão constitui cópia não controlada. 1 / 1

D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA
 NII: ePT3AA02498
 Zona Industrial da Catrala | Apartado 50 | 3441 - 909 Santa Comba Dão
 Tlx: 232 88 00 20 | Fax: 232 88 00 21
 e-mail: geral@din.pt | www.din.pt

Data de Emissão: 15 maio 2018
Departamento Técnico
Versão 01/15052018

Figura 1 – Ficha técnica do produto Swine Sweet Health desenvolvido.

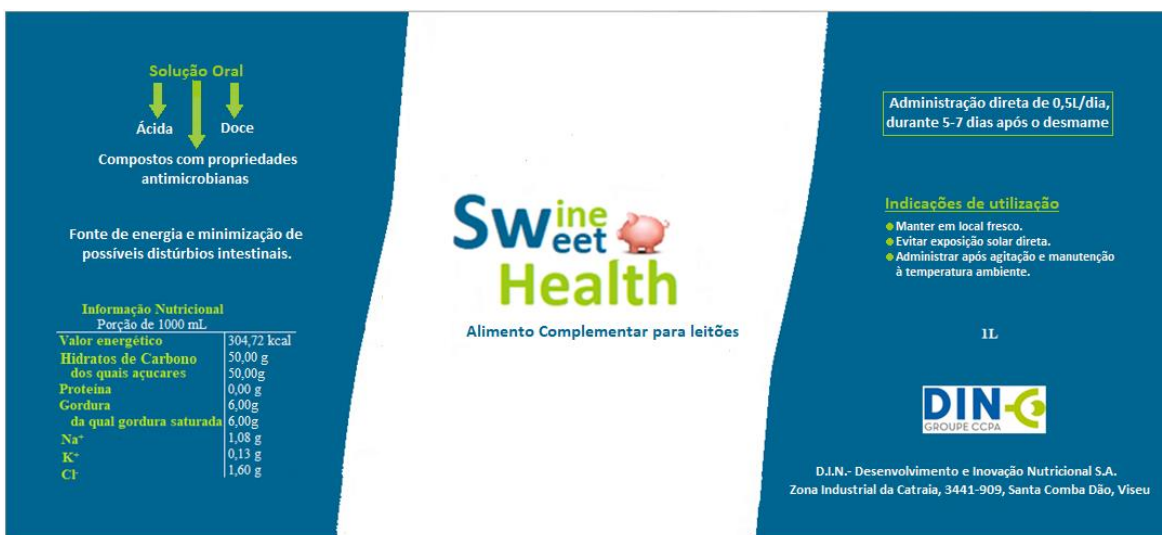
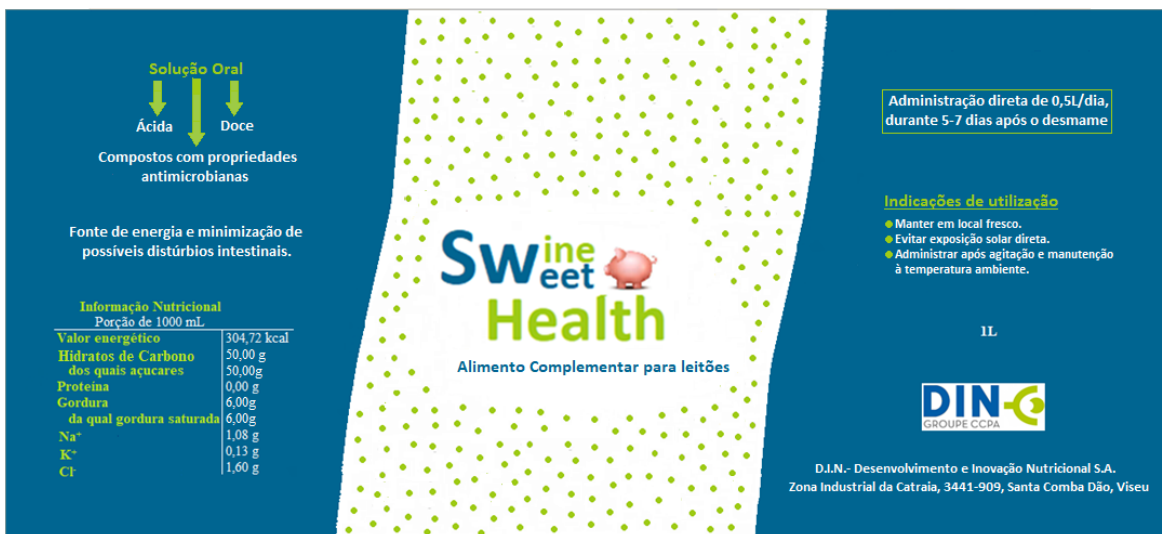


Figura 2- Dois esboços do rótulo do produto Swine Sweet Health desenvolvido.

Anexo 3- Curvas de calibração de Na^+ obtidas nos dias 1, 15 e 30 de estudo. No dia 30, não foi possível a medição das amostras de uma só vez.

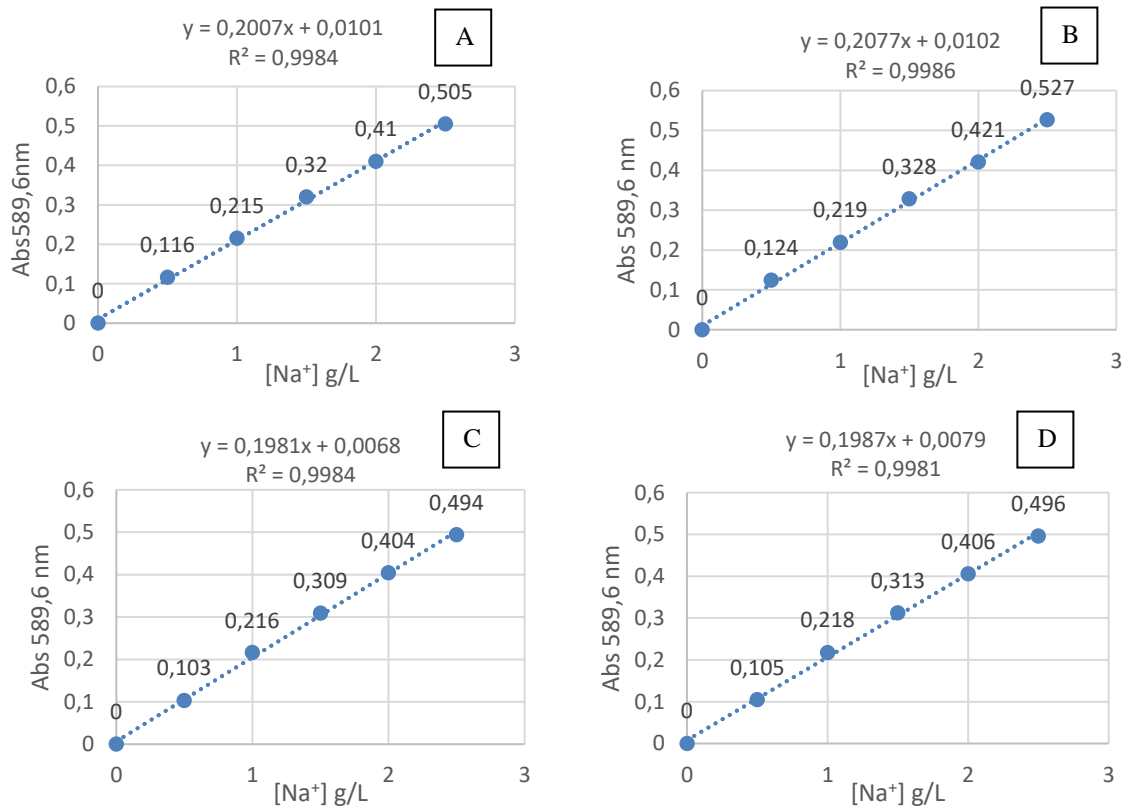


Figura 3 – Curvas de calibração do Na^+ , ao comprimento de onda 589,6 nm, obtidas a partir de soluções padrão de 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0 e 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Na^+ , previamente preparadas, no dia 1 (A), no dia 15 (B) e no dia 30 (C e D).

Anexo 4 - Curvas de calibração de K^+ nos 1, 15 e 30 de estudo. No dia 30, não foi possível a medição das amostras de uma só vez.

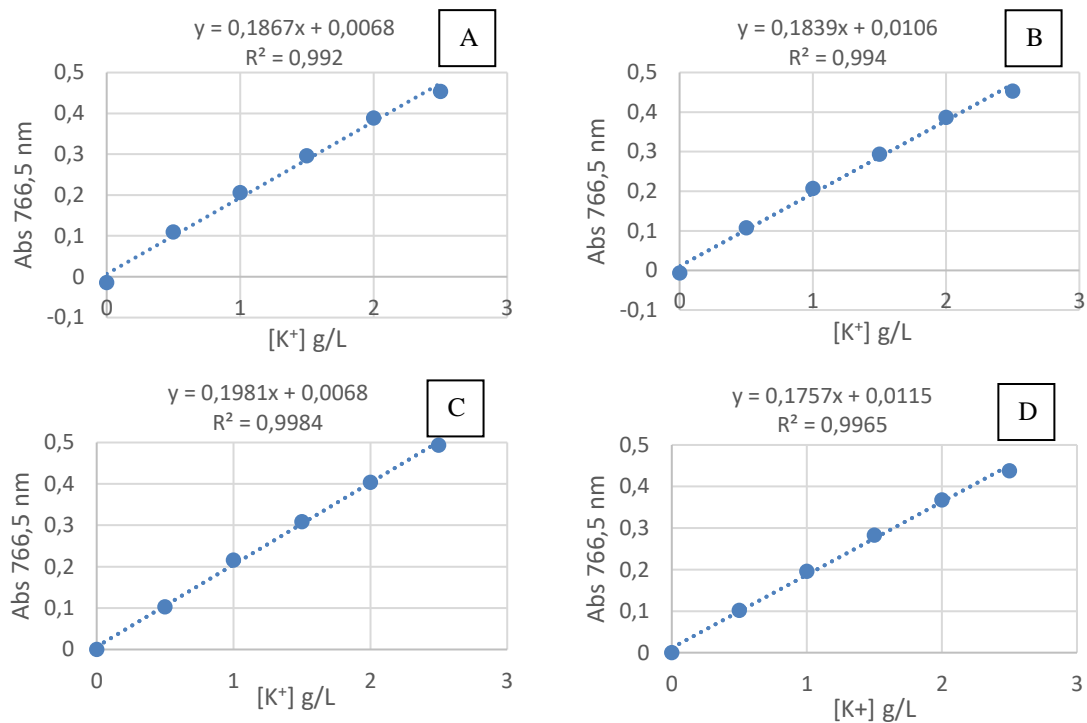


Figura 4 - Curvas de calibração obtidas através da medição da absorção atômica de K^+ , ao comprimento de onda 766,5 nm, de soluções padrão de 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de K^+ , previamente preparadas, no dia 1 (A), no dia 15 (B) e no dia 30 (C e D).

Anexo 5- Cromatogramas de HPLC obtidos a partir de soluções padrão de 0,25 %, 0,5 % e 1 % de glucose.

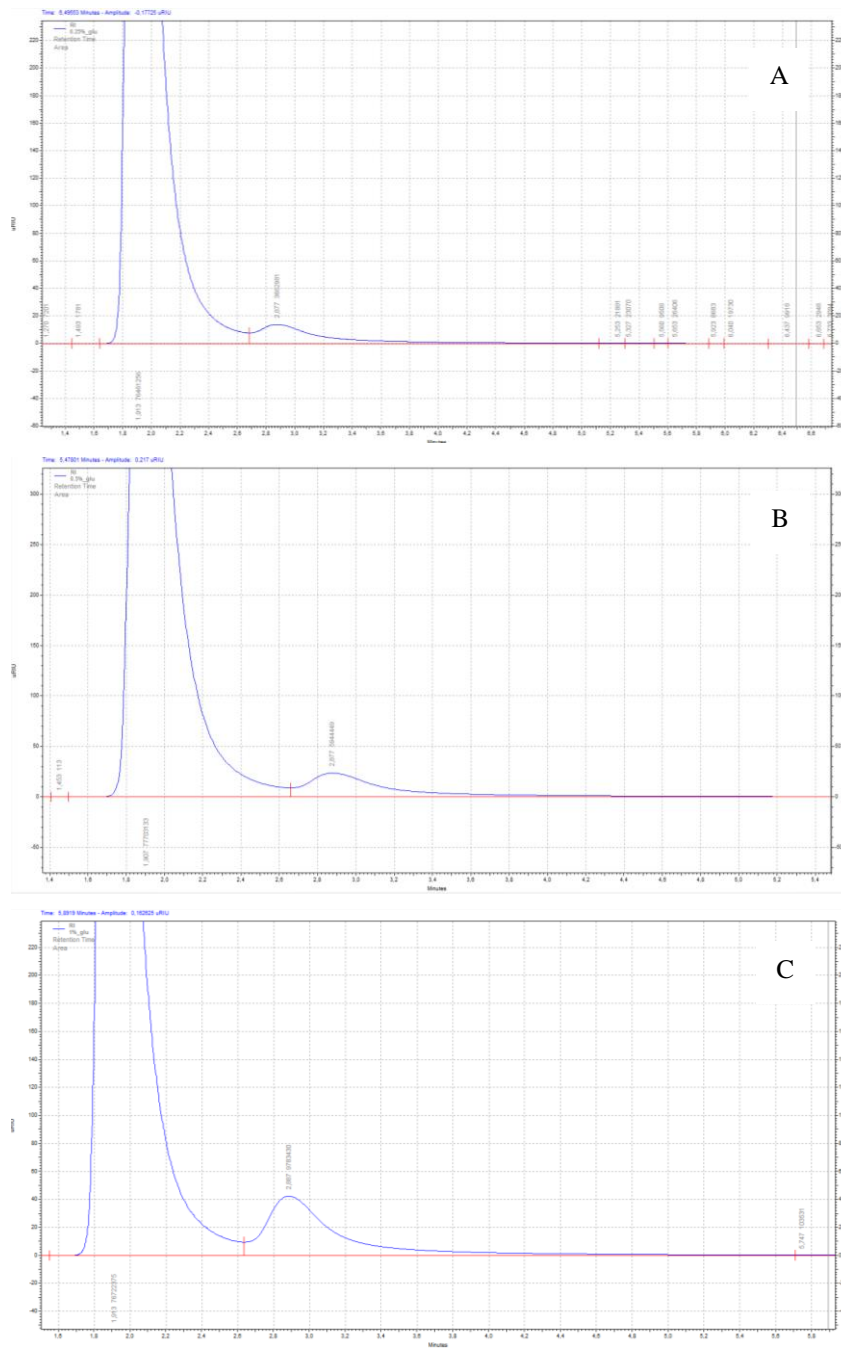


Figura 5 - Cromatogramas de HPLC obtidos, após a injeção automática de soluções padrão de 0,25 % (A), 0,5 % (B) e 1 % (C) de glucose, utilizados na criação de uma curva de calibração de glucose.

Anexo 6 – Curva de calibração de glucose, obtida a partir de soluções padrão de 0,25 %, 0,5 % e 1 % de glucose.

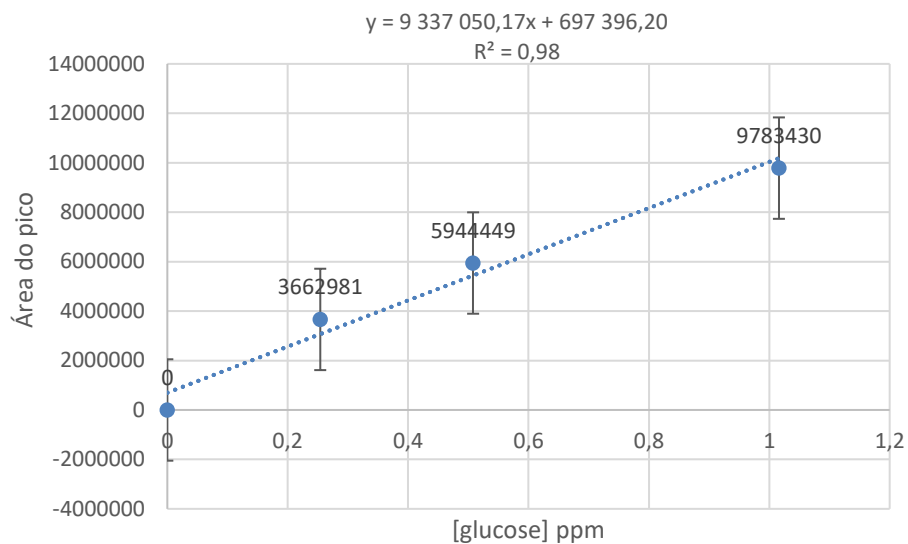


Figura 6 - Curva de calibração obtida, através da medição das áreas do pico correspondentes à glucose, ao tempo de retenção 2,877 minutos, pelos cromatogramas de HPLC, após a injeção automática de soluções padrão de 0,25 %, 0,5 % e 1 % de glucose.

Anexo 7 - Cromatogramas da concentração de glucose da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos por HPLC, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, nos dias 1, 15 e 30 de estudo.

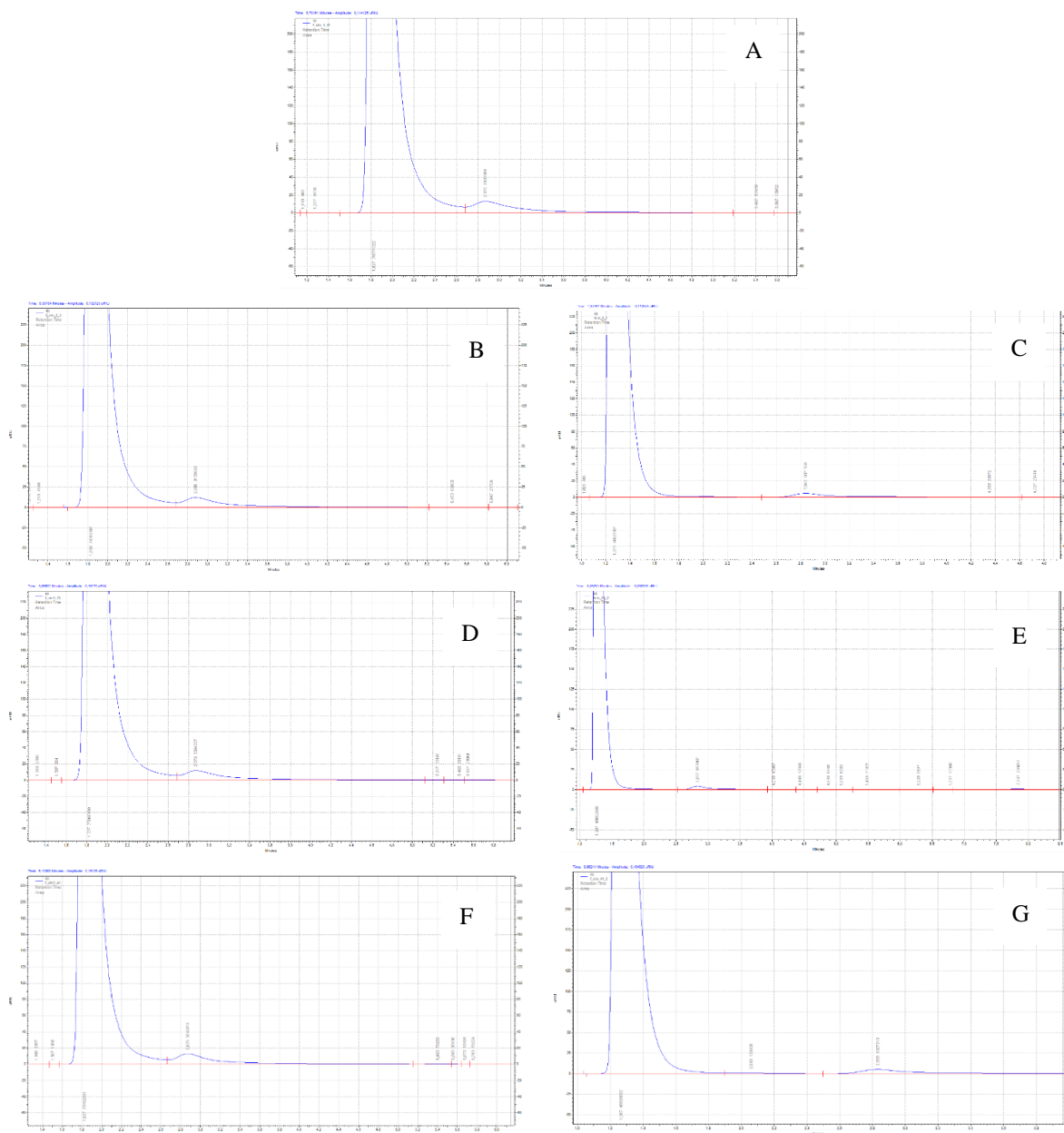


Figura 7 - Cromatogramas da concentração de glucose, obtidos por HPLC com um detector RI, da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtidos nos dias 1 (A) e a 5 °C, nos dias 15 (B) e 30 (C), a 25 °C, nos dias 15(D) e 30 (E), e a 41,5 °C, nos dias 15 (F) e 30 (G) de estudo.

Anexo 8 – Curva de calibração de ácido láurico, obtida por GC-FID.

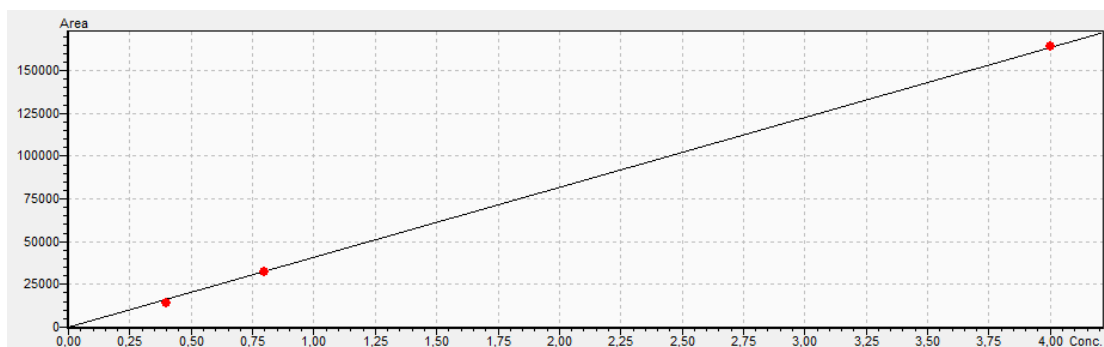
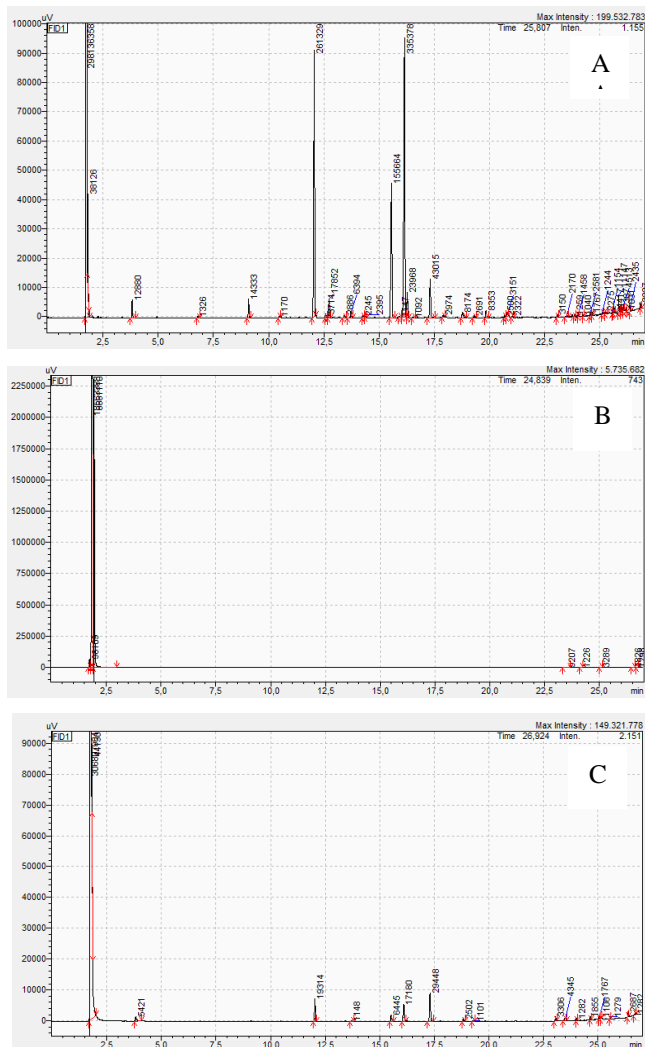


Figura 8 - Curva de calibração de ácido láurico, obtida por GC-FID automaticamente, pelo método já estabelecido na D.I.N. para avaliação do perfil lipídico de amostras de nutrição humana e animal.

Anexo 9 - Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico da formulação contendo apenas cinamaldeído, obtido por GC-FID no dia 30, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.



Anexo 10 – Curvas de calibração de Na^+ , obtidas a partir de soluções padrão de 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Na^+ . Não foi possível a medição das amostras todas de uma só vez, traçando-se duas curvas de calibração.

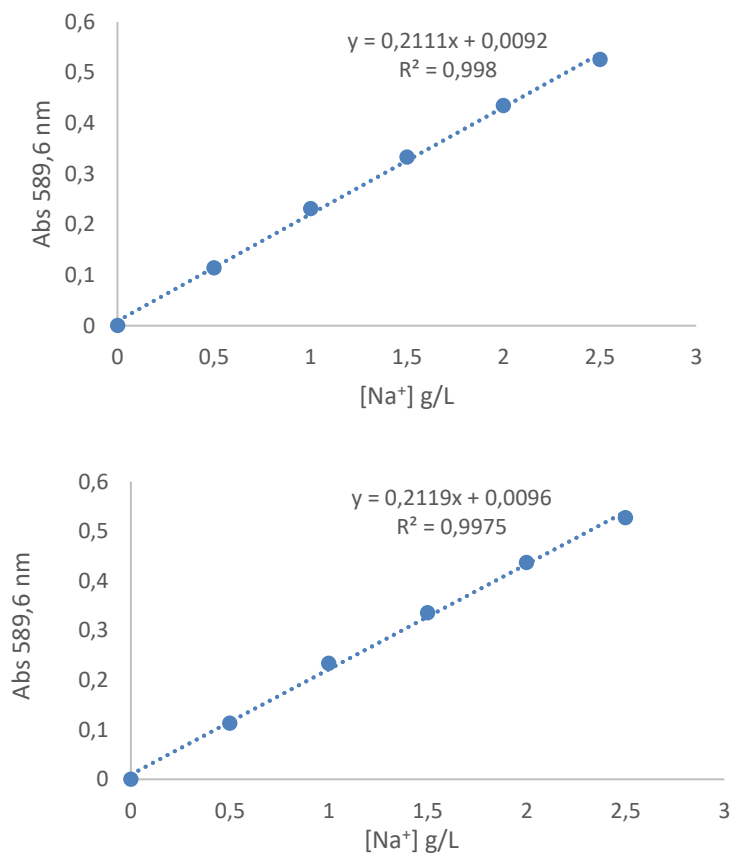


Figura 10 - Curvas de calibração obtidas através da medição da absorção atômica de Na^+ , ao comprimento de onda 589,6 nm, de soluções padrão de 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Na^+ , previamente preparadas, para posterior análise das amostras da formulação de cinamaldeído induzidas a stress com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, no dia 2 de estudo. Não foi possível a medição das amostras todas de uma só vez, tendo sido criadas duas curvas de calibração, a partir das mesmas soluções padrão de Na^+ .

Anexo 11 – Curvas de calibração de K^+ , obtidas a partir de soluções padrão de 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ deste ião. Não foi possível a medição das amostras todas de uma só vez, traçando-se duas curvas de calibração.

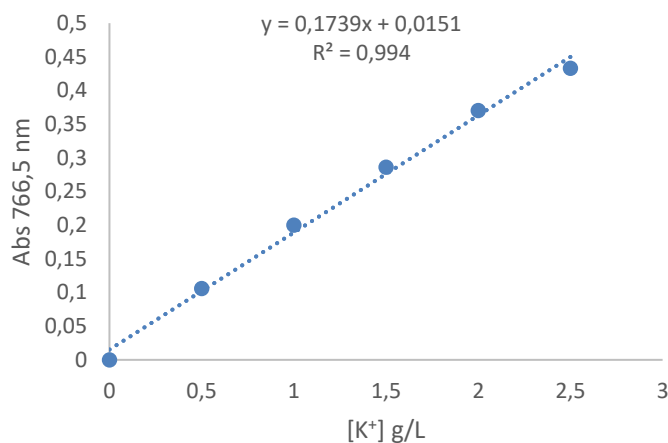
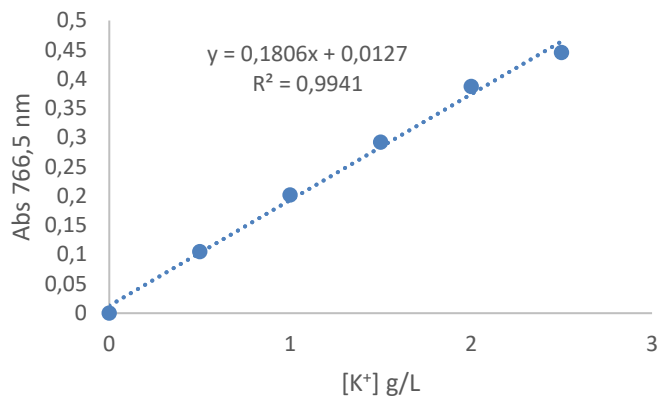


Figura 11- Curvas de calibração de K^+ , obtidas a partir de soluções padrão de 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de K^+ , previamente preparadas, para posterior análise das amostras da formulação de cinamaldeído, induzidas a stress com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, no dia 2 de estudo. Não foi possível a medição das amostras todas de uma só vez, tendo sido criadas duas curvas de calibração, a partir das mesmas soluções padrão de K^+ .

Anexo 13 - Cromatogramas da concentração de glucose, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtidos por HPLC, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C, nos dias 1, 15 e 30 de estudo.

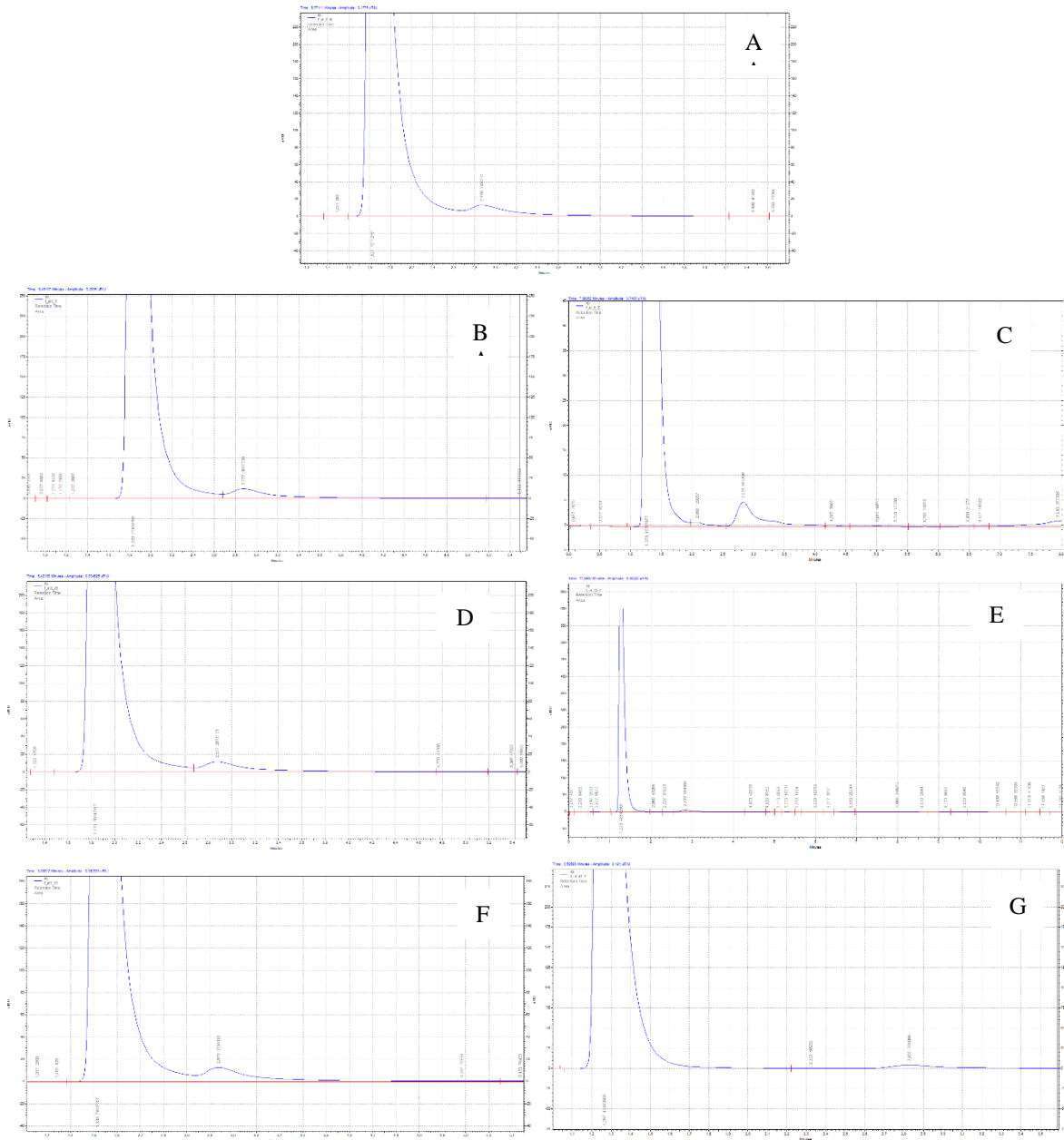


Figura 13 – Cromatogramas da concentração de glucose, obtidos por HPLC com um detector RI, da formulação contendo apenas óleo de coco, obtidos nos dias 1 (A) e a 5 °C, nos dias 15 (B) e 30 (C), a 25 °C, nos dias 15(D) e 30 (E), e a 41,5 °C, nos dias 15 (F) e 30 (G) de estudo.

Anexo 14- Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico, da formulação contendo apenas a emulsão de óleo de coco, obtido por GC-FID no dia 30, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

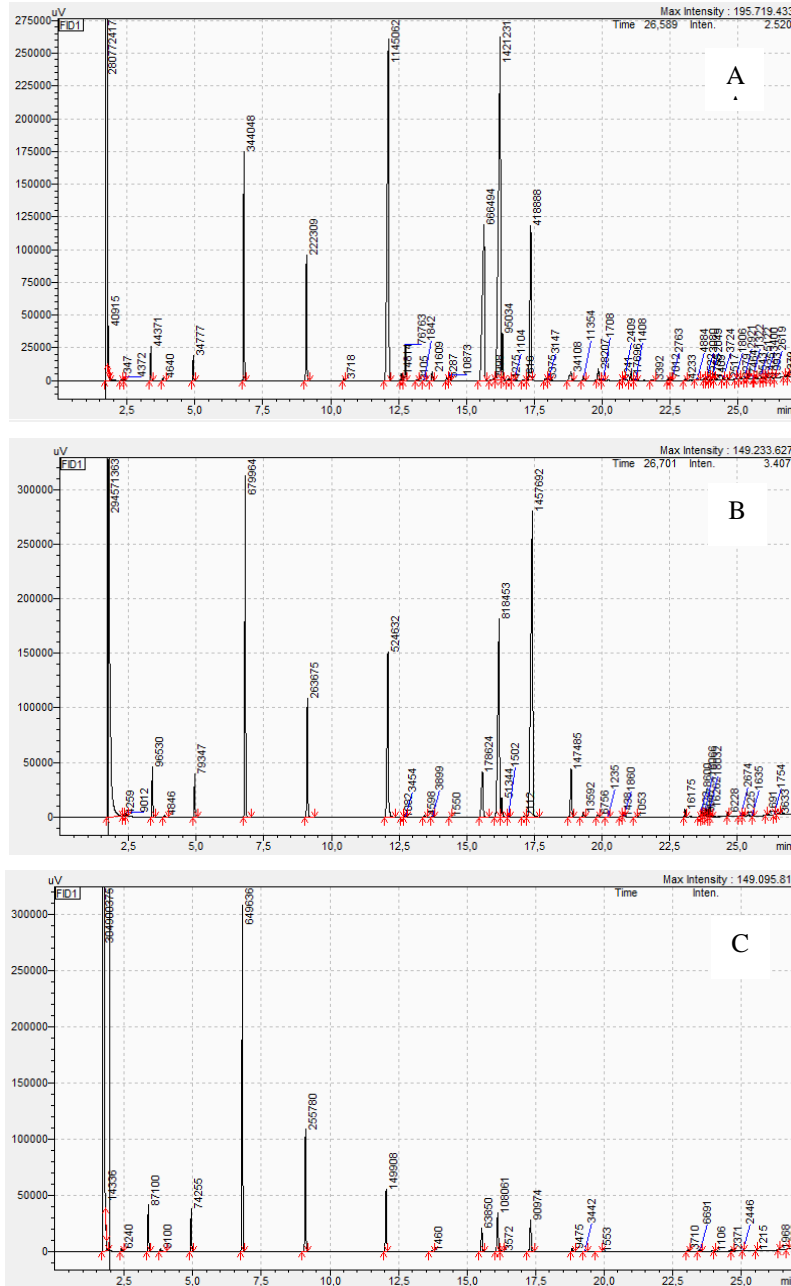


Figura 14- Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico da formulação contendo apenas óleo de coco, obtido por GC-FID no dia 30, a 5 °C (A), 25 °C (B) e 41,5 °C (C).

Anexo 15 – Cromatogramas da concentração de glucose, avaliada por HPLC com um detetor RI, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos nos dias 1, 15 e 30 de estudo, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

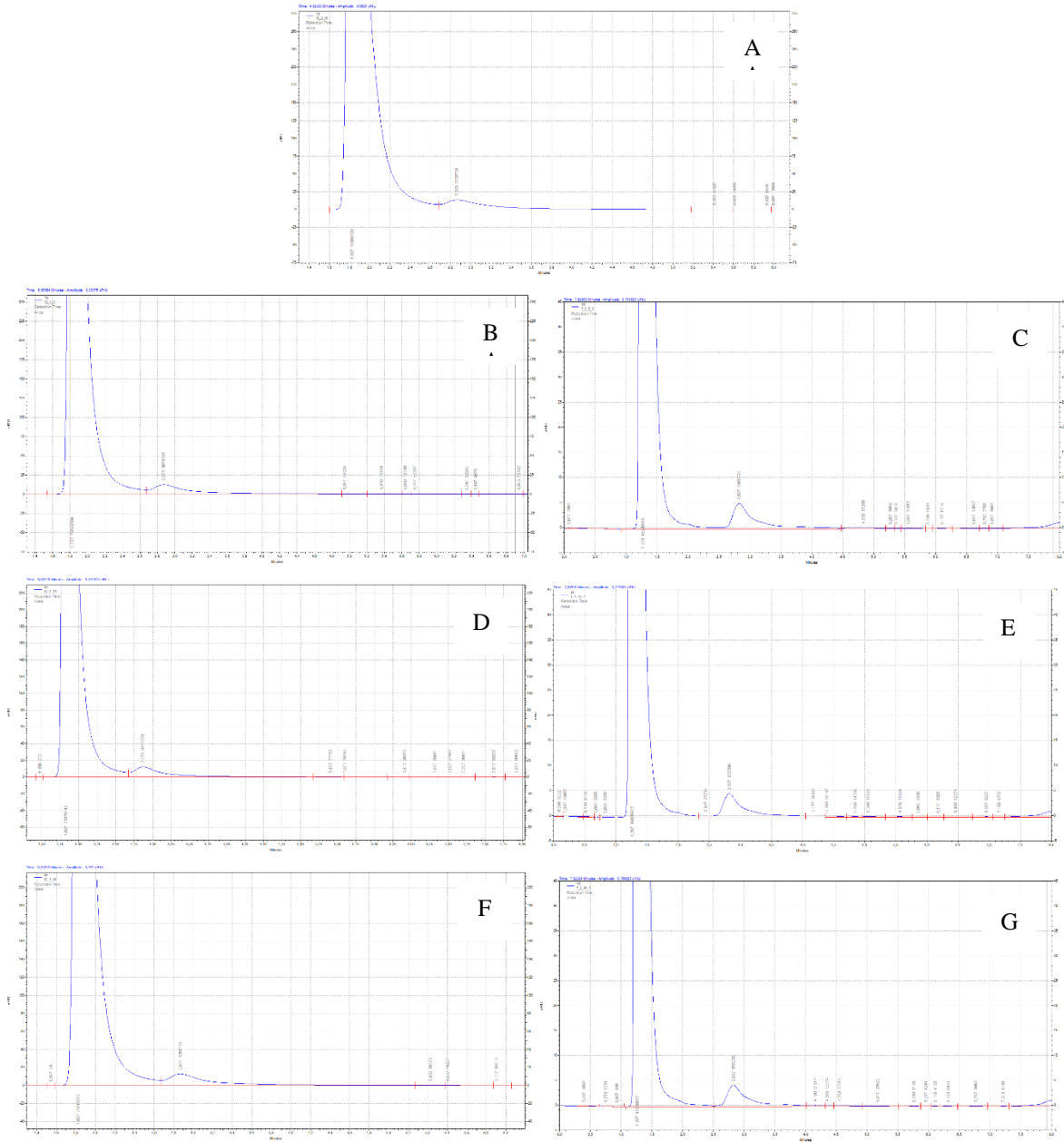


Figura 15 – Cromatogramas da concentração de glucose, obtidos por HPLC com um detetor RI, da formulação contendo apenas óleo de coco, obtidos nos dias 1 (A) e a 5 °C, nos dias 15 (B) e 30 (C), a 25 °C, nos dias 15(D) e 30 (E), e a 41,5 °C, nos dias 15 (F) e 30 (G) de estudo.

Anexo 16- Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico, da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos por GC-FID no dia 30, a 5 °C, 25 °C e 41,5 °C.

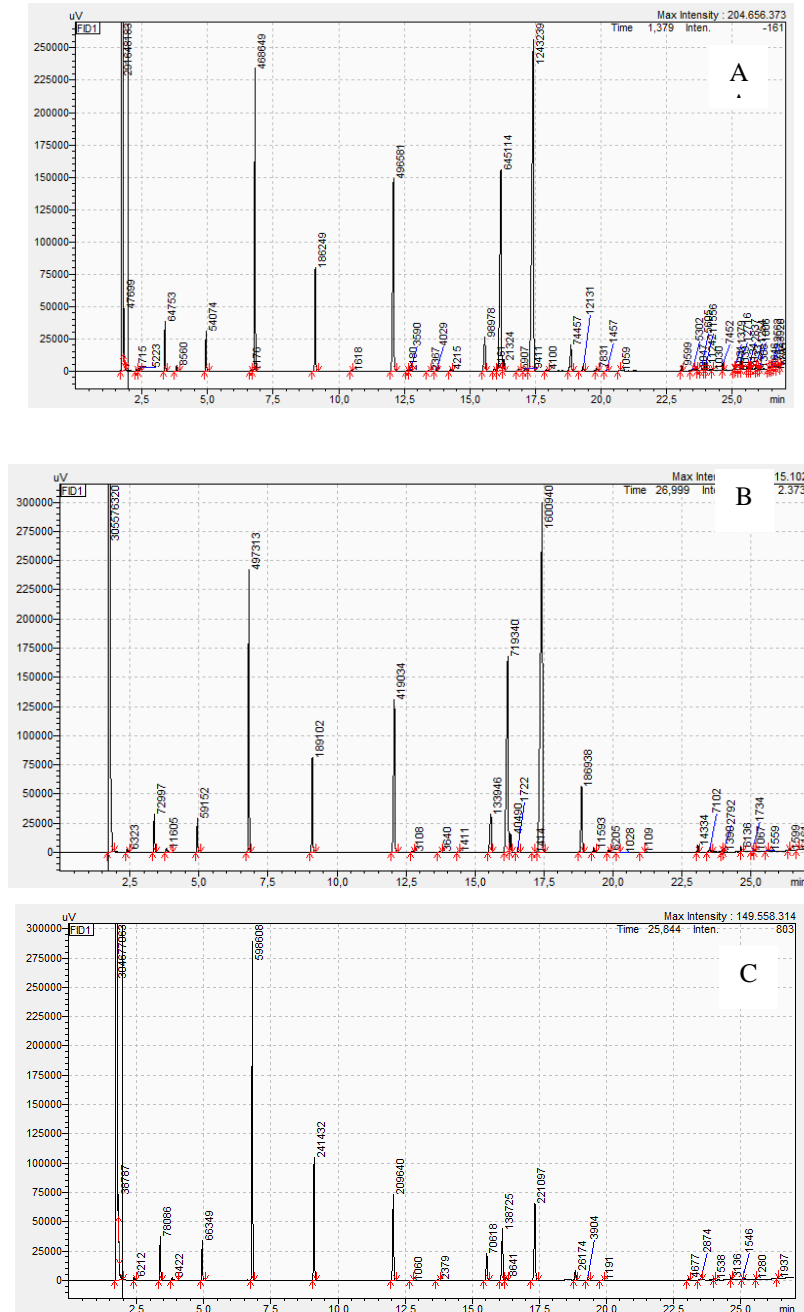


Figura 16- Cromatogramas da avaliação do perfil lipídico da formulação contendo cinamaldeído e a emulsão de óleo de coco, obtidos por GC-FID no dia 30, a 5 °C (A), 25 °C (B) e 41,5 °C (C).