

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MARLI BUSANELLO

**ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO COM CÉLULAS VIÁVEIS E
INATIVADAS EM LEITÕES**

Marechal Cândido Rondon

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MARLI BUSANELLO

**ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO COM CÉLULAS VIÁVEIS E
INATIVADAS EM LEITÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”.

Orientadora: Prof^a. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza

Marechal Cândido Rondon

2011

A Deus pelo dom da vida;
A Nossa Senhora Aparecida que sempre está ao
meu lado me protegendo, guiando meus passos e
atendendo minhas preces;
A minha família, meu porto seguro, em especial
meus pais, Angelo e Nadir e meus irmãos
Edilson, Ademir e Mauro, amo-os mais que tudo!

Dedico !

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, pela oportunidade de aprendizado e conhecimento, pessoal e profissional;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa;

Ao meu pai Angelo pelo amor incondicional e incentivo, a minha mãe Nadir que eu tanto amo, pelas orações e palavras de apoio ao telefone... à vocês que nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar este momento e que são meus exemplos de vida;

Aos meus irmãos Edilson, Ademir e Mauro pelo amor, confiança e por sempre me apoiarem, e as minhas cunhadas Elizete, Daiane e Everlise, pelo carinho;

As minhas amadas sobrinhas (os), Luana, Karine, Lucas, Danter e Amanda, pelos seus sorrisos sinceros que tornam minha vida muito mais feliz! Amo-os profundamente!

Ao senhor Milton e Maurício O. Wochner pela confiança depositada em mim ao abrir as portas da granja para que esse experimento pudesse ser realizado e a todos os colaboradores da granja, em especial Angela Cristiane Thoraz Bamumgartne e Walmir José Baumgartner pelas ajudas;

Em especial, a minha orientadora, professora Dra. Magali Soares dos Santos Pozza, pela orientação desde a graduação, pelos ensinamentos e pelo incentivo a pesquisa e ao aprendizado;

Ao meu coorientador, professor Dr. Paulo Cesar Pozza, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo;

Ao professor Dr. Ricardo Vianna Nunes, pela paciência comigo, por toda a ajuda e colaboração durante todo o mestrado, especialmente na dissertação;

A todos os professores do mestrado, em especial, professora Yolanda Lopes da Silva pelas sugestões feitas na banca de qualificação e ao professor Cláudio Yuji Tsutsumi pelo valioso auxílio nos dados estatísticos;

As professoras da banca da defesa, Dra. Jovanir Inês Muller Fernandes e. Christiane Garcia Vilela, pelas sugestões e contribuições no enriquecimento deste trabalho;

Ao Secretário do PPZ Paulo H. Morsch pelas incontáveis ajudas em todos os momentos, muito obrigada;

A Elizete Andréia Griep, pelos oito anos de convivência, pelas incontáveis ajudas e apoio, e que se tornou para mim uma segunda família, obrigada de coração;

A Ana Paula Sartorio Chambo, que foi, é e sempre será muito mais que uma amiga, irmã, confidente, que sempre esteve ao meu lado principalmente quando as dificuldades se fizeram presentes, pela preciosa ajuda durante o experimento, por tudo que aprendi com você, pelos belos momentos de descontração, por sempre ter um ombro amigo a oferecer e pela eterna amizade que levarei por toda a vida;

As minhas eternas amigas, Naldiane Borella, Ivete Scheneider, Simone Kusiak e Mayara Rodrigues, que mesmo distante se fizeram sempre presentes... não existe riqueza maior que uma amizade sincera;

A Priscylla Cenci de Barros, pela eterna amizade e por toda a ajuda principalmente no experimento, por ter passado o natal comigo alimentando os leitões...sem você as coisas teriam sido muito mais difíceis;

Ao Ilton Isandro Eckstein, pela amizade sincera, por não medir esforços e estar sempre disposto a ajudar, por dividir comigo as preocupações, por todas as idas e vindas à granja, pela ajuda imprescindível, meu sincero agradecimento;

Aos meus compadres Sandra e Ivan Ramão, pelos carinhosos telefonemas;

A Joice Alexandre da Silva... Joice, Deus coloca as pessoas na hora certa em nossas vidas, obrigada por tudo;

A Tatiane Fernandes, Evelyn Alfonzo, Rogério Lopes Estevez, Maikel Possamai, Douglas Batista Lazzeri e Leandro Dalcin Castilha, pela preciosa colaboração durante o experimento;

A Cristiane Meinner, sempre prestativa em ajudar, pelos incontáveis empréstimos de material de laboratório durante todo o mestrado e pela amizade que formamos;

A Leslié Defante, por compartilharmos as dúvidas, preocupações e soluções da dissertação;

A Francieli Batista da Silva, Silia Negreiros, Fernanda Jacobus de Moraes, Aparecida da Costa Oliveira, Debora Cristiane Freitag, Vitor Schone, Francisco Dolejal, João de Moraes Pereira Junior, Fabio Luiz Trento, pelos preciosos momentos vividos;

A todos os vigias, sempre prestativos, em especial ao seu Olívio que sempre tinha uma nova “história” para contar;

Meu sincero agradecimento a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Todas as obras do Senhor são boas, ele põe cada coisa em prática quando chega o seu tempo. Não a razão para dizer: “Isto é pior que aquilo”, porque todas as coisas serão achadas boas a seu tempo”. (Eclesiástico 39, 39-40)

RESUMO

MARLI BUSANELLO; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; março de 2011;
Administração oral de probiótico com células viáveis e inativadas em leitões
Orientadora: Dra. Magali Soares dos Santos Pozza, Coorientador: Dr. Paulo Cesar Pozza

O objetivo foi avaliar o uso oral de probiótico com células viáveis e inativadas (“pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum* de origem gastrointestinal de suínos), no desempenho, na microbiota intestinal e no sistema imune de leitões durante as fases de aleitamento e creche. Foram utilizados, na fase de aleitamento, 108 leitões e para a fase de creche 72 leitões desmamados aos 21 dias de idade, distribuídos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram: tratamento A: 1 ml de caldo MRS + 1 ml de solução salina estéril; tratamento B: 1 ml de probiótico ($8,60 \times 10^7$ UFC/ml de um “pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum*) ativas no caldo MRS + 1 ml de solução salina; tratamento C: 1 ml de probiótico contendo células inativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina. Os tratamentos foram administrados via oral aos leitões diariamente no período da manhã, do nascimento aos 35 dias de idade sendo 1 ml por animal na fase de aleitamento e 2 ml na fase de creche. As contagens de bactérias acidoláticas e coliformes não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos e tempos de coleta. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos para ganho de peso e ganho diário de peso dos leitões do nascimento aos 21 dias de idade. Dos 21 aos 35 dias de idade observou-se para o tratamento controle menor consumo e menor consumo diário de ração ($P < 0,05$) quando comparado aos tratamentos probióticos e maior ganho de peso e ganho diário de peso ($P < 0,05$) foi observado no tratamento probiótico com células inativadas em relação ao tratamento probiótico com células viáveis e o controle. Observou-se menor concentração ($P < 0,05$) de globulina nos tratamentos com probióticos em relação ao controle. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para as variáveis proteínas séricas totais, albumina, glicose, hemoglobina, leucócitos, hematócrito, hemácias, eosinófilos, bastões, segmentados, linfócitos, monócitos, plaquetas e para os níveis séricos de IgA entre os tratamentos. Concluiu-se que o uso oral de probiótico com células viáveis e inativadas não alterou as contagens microbiológicas, os valores das proteínas séricas totais, albumina, glicose, hemograma e

IgA e uso de probióticos com células viáveis e inativadas diminuiu os níveis séricos de globulina.

Palavras-chave: desempenho, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp.*, microbiota intestinal, parâmetros sanguíneos, suínos

ABSTRACT

MARLI BUSANELLO, State University of West of Paraná, in March 2011;
Administration oral probiotic with viable cells and inactivated in piglets.
Adviser: Dra. Magali dos Santos Soares Pozza, Committee member: Dr. Paulo Cesar Pozza

The objective was to evaluate the use oral probiotic of with viable cells and inactivated ("pool" of *Lactobacillus sp.* and *Lactobacillus plantarum* of gastrointestinal origin of pigs), on performance, intestinal microbiota and the immune system of piglets during the stages of lactation and creche. Were used, 108 lactating piglets and for nursery phase 72 piglets weaned at 21 days old, divided into an experimental design of randomized blocks with three treatments and six replicates. The treatments were: Treatment A: 1 ml of MRS broth + 1 ml of sterile saline, treatment B: 1 ml of probiotic (8.60×10^7 CFU/ml of a "pool" of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sp.* activated MRS broth + 1 ml of saline, treatment C: 1 ml of probiotic inactivated cells in MRS broth + 1 ml of saline. Treatments were administered orally to piglets in the daily morning, from birth to 35 days of age with 1 ml per animal lactating and 2 ml in the nursery phase. The count of acidoláticas bacteria, and coliforms were not affected ($P > 0.05$) by treatments and sampling times. There was no effect ($P > 0.05$) of treatments for weight gain and weight gain daily of piglets from birth to 21 days old. From 21 to 35 days of age was observed lower consumption and lower daily feed intake ($P < 0.05$) for the control treatment when compared to the probiotic treatments and greater weight gain and weight daily gain ($P < 0.05$) was observed in probiotic treatment with cells inactivated in relation to probiotic treatment with viable cells and control. There was less concentration ($P < 0.05$) globulin in the treatment with probiotics compared to control. There were no significant differences ($P > 0.05$) for the variables serum protein, albumin, glucose, hemoglobin, leukocytes, hematocrit, red blood cells, eosinophils, sticks, segments, lymphocytes, monocytes, platelets and serum levels of IgA between treatments. It was concluded that oral use of probiotics with viable cells and inactivated did not alter microbial counts, the values of serum protein, albumin, glucose, blood count and IgA and use of probiotics with viable and inactivated cells diminished serum globulin.

Key words: performance, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp.*, intestinal microbiota, blood parameters, pigs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 Revisão de Literatura	16
2.1 Probióticos na alimentação animal	16
2.2 Modos de ação dos probióticos	18
2.2.1 Competição por sítios de ligação ou exclusão competitiva.....	18
2.2.2 Estímulo ao sistema imune	19
2.2.3 Efeito nutricional	20
2.2.4 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas.....	21
2.3 Micro-organismos probióticos inativados	22
2.4 Microbiota do trato gastrointestinal dos leitões	22
2.5 Características Hematológicas	24
2.6 Sistema imunológico e produção de IgA.....	25
2.7 Referências	27
3 ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO COM CÉLULAS VIÁVEIS E INATIVADAS PARA LEITÕES NA FASE DE ALEITAMENTO E CRECHE	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT:	35
3.1 Introdução.....	36
3.2 Material e métodos.....	37
3.2.1 Delineamento experimental.....	38
3.2.2 Origem das cepas	39
3.2.3 Liofilização das cepas probióticas	39
3.2.4 Manutenção e preparo das culturas probióticas	40
3.2.5 Composição das rações.....	41
3.2.6 Análises microbiológicas das amostras fecais	43

3.2.7 Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar dos leitões do nascimento aos 35 dias de idade.....	43
3.2.8 Modelo experimental utilizado	44
3.3 Resultados e discussão.....	45
3.3.1 Desempenho dos leitões na fase de aleitamento e creche	45
3.3.2 Contagens de bactérias acidoláticas e coliformes de fezes de leitões, na fase de aleitamento e creche	48
3.4 Conclusões.....	51
3.5 Referências	51
4 ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO COM CÉLULAS VIÁVEIS E INATIVADAS SOBRE OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS EM LEITÕES NA FASE DE ALEITAMENTO E CRECHE	56
RESUMO:.....	56
ABSTRACT:	57
4. 1 Introdução.....	58
4.2 Material e métodos.....	59
4.2.1 Delineamento experimental.....	59
4.2.2 Origem das cepas	60
4.2.3 Liofilização das cepas probióticas	61
4.2.4 Manutenção e preparo das culturas probióticas	62
4.2.5 Composição das rações.....	62
4.2.6 Parâmetros Sanguíneos.....	64
4.2.6.1 Análises de Hemograma.....	64
4.2.6.2 Análises de Imunoglobulina A (IgA)	64
4.2.6.3 Análises de proteínas totais, albumina sérica, globulina e glicose	64
4.2.7 Modelo experimental utilizado	65
4.3 Resultados e discussão.....	66
4.3.1 Parâmetros sanguíneos dos leitões dos tratamentos controle e probiótico com células viáveis e inativadas.....	66

4.3.2 Valores do hemograma dos leitões dos tratamentos controle e probiótico com células viáveis e inativadas.....	68
4.3.3 Valores séricos de imunoglobulina A (IgA) dos leitões.....	72
4.4 Conclusões.....	75
4.5 Referências	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 01. Viabilidade celular (UFC/ml) de cepas de lactobacilos de origem gastrointestinal de suínos antes e após o processo de liofilização	40
Tabela 02. Composição centesimal das rações utilizadas para leitões dos 10 aos 21 e dos 21 aos 35 dias de idade	42
Tabela 03. Desempenho dos leitões dos grupos-controle, probiótico com células viáveis e inativadas na fase de aleitamento do nascimento aos 21 dias de idade	45
Tabela 04. Desempenho dos leitões dos grupos-controle, probiótico com células viáveis e inativadas na fase de creche dos 21 aos 35 dias de idade	46
Tabela 05. Número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) de bactérias acidoláticas e coliformes totais nas fezes de leitões em relação aos diferentes tratamentos e dias de coleta.	49

CAPÍTULO 4

Tabela 01. Viabilidade celular (UFC/ml) de cepas de lactobacilos de origem gastrointestinal de suínos antes e após o processo de liofilização	61
Tabela 02. Composição centesimal das rações utilizadas para leitões dos 10 aos 21 e dos 21 aos 35 dias de idade	63
Tabela 03. Valores de proteínas séricas totais, albumina, globulina e glicose no sangue de leitões dos diferentes tratamentos e dias de coleta	66
Tabela 04. Hemograma dos leitões de acordo com os tratamentos e diferentes dias de coleta de sangue	70
Tabela 05. Níveis séricos de IgA nos leitões em função dos tratamentos e dos diferentes dias de coleta.....	72

1 INTRODUÇÃO

Para continuar alcançando sucesso na produção e conseqüentemente retorno econômico cada vez mais eficiente, todas as fases de criação necessitam planejamento e cuidados, sendo as fases de aleitamento e de creche que demandam os maiores cuidados.

O uso de antimicrobianos, sobretudo, nestas duas fases tem comprovada capacidade de melhorar o desempenho dos animais, porém o uso destes aditivos vem sendo restringido devido à possibilidade de deixar resíduos na carne, e a indução de resistência cruzada para bactérias patogênicas em humanos (MENTEN, 2002).

A retirada de antimicrobianos resulta para a suinocultura prejuízos como a queda da produtividade na fase de creche que corresponde ao período crítico pós-desmame. A idade e o peso ao desmame estão intimamente relacionados à taxa de crescimento influenciando no desempenho final (QUINIOU et al., 2002). O estresse provocado por ocasião da desmama promove respostas fisiológicas e metabólicas que podem alterar o padrão sanguíneo normal do animal (THOMAZ, 2009).

Nas fases de aleitamento e creche, o trato gastrointestinal dos leitões encontra-se em desenvolvimento, apresentando uma microbiota endógena a qual tem um profundo impacto sobre o desenvolvimento normal dos sistemas fisiológicos, imunológicos e morfológicos do animal (KONSTANTINOV e SMIDT, 2008, WILLING e VAN KESSEL, 2007). O estabelecimento de uma população microbiana estável em suínos jovens exerce uma profunda influência sobre o potencial de crescimento e saúde dos animais nas fases de crescimento e terminação (TARAS et al., 2006).

Como a microbiota intestinal desempenha importante papel no desenvolvimento e na manutenção da resposta imune intestinal (YAMANAKA et al., 2003), estudos nesta área têm atraído interesse devido à possibilidade de promover a manipulação terapêutica da microbiota intestinal para melhorar a saúde dos hospedeiros pela administração de diversas espécies de micro-organismos, como os probióticos.

Gibson e Roberfroid (1995) definem os probióticos como suplementos alimentares constituídos por micro-organismos que afetam benéficamente o hospedeiro, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que possuem propriedades promotoras de saúde e são usados para alterar a composição e promover equilíbrio da microbiota intestinal.

Neste sentido, a utilização de bactérias benéficas, como as bifidobactérias, lactobacilos e algumas espécies de enterococos, contribuem para uma melhor absorção de nutrientes pelas

células intestinais, através do estabelecimento de um ambiente intestinal equilibrado, e um sistema imunológico saudável (BALLONGUE, 2004, BAUER, 2006).

A utilização dos probióticos principalmente na fase inicial da vida dos leitões e em períodos de estresse como o desmame, contribui para a manutenção da microbiota do intestino delgado, assegurando a integridade do epitélio intestinal e garantindo portanto uma maior absorção de nutrientes (FREITAS, 2008).

Em condições normais, a imunidade dos animais encontra-se em níveis adequados, porém quando submetidos a situações de estresse podem predispor a ocorrência de deficiências imunes, tornando-os vulneráveis à infecções. Sob estas circunstâncias, a suplementação com micro-organismos vivos, como os probióticos, pode modular a composição da microbiota intestinal, estimulando a resposta imune e restaurando a resistência do animal à infecção.

A viabilidade dos micro-organismos é uma condição necessária para a adesão das células aos receptores da mucosa intestinal. No entanto, produtos inativados podem inibir a ação de bactérias e vírus que causam diarreia em suínos, ligando-se aos sítios de adesão na mucosa intestinal e impedindo a fixação de células patogênicas (COCONIER et al., 1993).

Os probióticos utilizados na suinocultura, viáveis ou inativados são compostos de bactérias lácticas que encontram-se naturalmente na microbiota intestinal dos leitões (RODRIGUES et al., 2007). Entretanto é importante avaliar se a viabilidade dos micro-organismos é uma condição essencial para a ação que os probióticos podem ter no organismo, ou se o processo de inativação reduz ou inibe essa ação.

Diante do exposto surge à necessidade de estudos que apontem os benefícios do uso de probióticos a base de células viáveis e inativadas no desempenho, na microbiota intestinal e no sistema imune de leitões em fase de aleitamento e creche.

2 Revisão de Literatura

2.1 Probióticos na alimentação animal

Os probióticos são cepas específicas de micro-organismos que agem como auxiliares na recomposição da microbiota intestinal dos animais, diminuindo a ocorrência dos micro-organismos patogênicos ou indesejáveis (CARDOZO, 2006). As bactérias mais comumente utilizadas são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* e

algumas espécies de leveduras como a *Saccharomyces* (GUPTA e GARG, 2009). Sendo as bactérias produtoras de ácido lático encontradas em grandes quantidades no intestino de animais saudáveis as mais empregadas na produção de probióticos (GONZALES, 2004).

FAO/WHO (2002), Annuk et al. (2003) citam que dentre os aspectos funcionais dos probióticos incluem-se tolerância à acidez gástrica, tolerância a atividade de hidrólise dos sais da bile, atividade antioxidante, produção de compostos antimicrobianos, capacidade de reduzir patógenos aderidos na superfície, habilidade de modulação da resposta imune e adesão no tecido intestinal. Dentre os aspectos tecnológicos importantes estão à capacidade de espécies probióticas de resistir as condições de produção industrial e sobreviver na formulação final do produto, além da habilidade das culturas em conservar sua função no trato gastrintestinal e co-existir com a microbiota própria do hospedeiro.

Segundo Santos e Turnes (2005), o emprego dos probióticos na nutrição não introduz nenhuma substância desconhecida no trato gastrointestinal dos animais, nem leva a riscos de infecção das carcaças ou em introduzir compostos perigosos na cadeia alimentar. No entanto, de acordo com O'Toole e Cooney, (2008) previamente ao uso comercial, os micro-organismos probióticos devem ser submetidos a diferentes testes para o reconhecimento de sua segurança como aditivo alimentar para humanos e animais.

Os probióticos contribuem para as características produtivas dos animais, aprimorando as condições intestinais para os processos de digestão e absorção dos nutrientes (PELICANO et al., 2004). Portanto, para uma boa eficiência, estes devem ser administrados já nos primeiros dias de vida para que tenham capacidade de modular beneficemente a microbiota intestinal, por meio dos seus mecanismos de ação (LORENÇON et al., 2007).

Para Fernandes et al. (2000), a suplementação de probiótico na dieta de não ruminantes pode ser preconizada a fim de auxiliar na manutenção, estabilidade, restabelecimento e permanência da microbiota intestinal não patogênica em neonatos após o desequilíbrio ocasionado por estresse ou uso de antibióticos. Segundo o NRC (1998), a espécie de micro-organismo, o histórico de doenças dos animais, o "status" sanitário da granja e a temperatura das instalações podem interferir na ação dos promotores de crescimento, inclusive dos probióticos.

Butolo (2001), Silva e Nörnberg (2003) citam que existem probióticos com composições distintas e, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie de micro-organismos, podem ser de diferentes cepas. O efeito dos probióticos é estritamente condicionado a quantidade e as características das cepas dos micro-organismos empregados. É importante as bactérias serem hospedeiro-específicas para que um melhor efeito seja obtido (SILVA e

ALVES FILHO, 2000), uma vez que em locais específicos no trato gastrointestinal estão presentes grupos de micro-organismos característicos, como bactérias bífidas predominantes no cólon e lactobacilos predominantes no intestino delgado, que modulam a microbiota, através de seus produtos metabólicos (FERREIRA, 2001).

As bactérias com capacidade probiótica quando isoladas do seu habitat natural cultivadas ou liofilizadas, podem perder determinadas propriedades, o que contribui para esclarecer a ineficiência de alguns probióticos. No entanto, ainda não se conhece a composição completa, e a perfeita combinação de micro-organismos que melhor estimulam as características probióticas “*in vivo*” (GHADBAN, 2002). E acredita-se que quanto melhores forem às condições sanitárias, menor estresse para o animal e mais equilibrada for a microbiota intestinal, menor será o efeito de antibióticos e probióticos (MACARI e FURLAN, 2005).

2.2 Modos de ação dos probióticos

A fundamentação da utilização de probióticos é a manipulação da microbiota intestinal favorecendo a saúde do hospedeiro e mantendo a probiose do animal, que conceitualmente é a habilidade dos micro-organismos benéficos de resistir ao crescimento excessivo e ao estabelecimento de cepas invasoras (GHADBAN, 2002).

Os micro-organismos que compõem os probióticos suplementados na dieta protegem o intestino dos animais contra bactérias patogênicas. Os modos de ação dos probióticos baseiam-se nos mesmos utilizados para a microbiota intestinal no desenvolvimento de suas funções, dentre eles, exclusão competitiva, estímulo ao sistema imune (UTIYAMA, 2004; BURITI, 2005), efeito nutricional, produção de substâncias antibacterianas e enzimas (UTIYAMA, 2004; SHIM, 2005).

2.2.1 Competição por sítios de ligação ou exclusão competitiva

Os micro-organismos probióticos viáveis quando adicionados à dieta passam a predominar aderindo-se ao epitélio intestinal, dificultando a adesão de bactérias patogênicas.

Estes micro-organismos também possuem maior capacidade de captura e metabolização de nutrientes presentes no lúmen do que os patogênicos que não estão aderidos (ROTH, 2000).

Os probióticos formam uma barreira física às bactérias patogênicas competindo com estas pelos nutrientes e receptores celulares. Um exemplo é a competição estabelecida entre a bactéria do gênero *Bifidobacterium* com a bactéria *Escherichia coli* enteropatogênicas (MACARI e FURLAN, 2005).

Cross (2002) demonstrou que a adição de *Lactobacillus* sp. na dieta de suínos, reduziu a fixação de *Escherichia coli* K88 à mucosa intestinal e os *Lactobacillus fermentum* produziram bacteriocinas, as quais apresentaram interação com os componentes da mucosa intestinal, ocasionando redução da fixação de enterobactérias e atuando também como bactericidas para estas bactérias.

Ross et al. (2010) ao utilizarem probiótico oral para suínos aos 35 dias de idade, observaram que aos 50 dias de idade ocorreu diminuição ($P \leq 0,05$) no número de enterobactérias no intestino de animais do grupo alimentado com probióticos em comparação ao controle.

Desta forma, segundo Nicoli e Vieira (2000), descreveram os micro-organismos probióticos competem com os patógenos na ocupação dos sítios de aderência nas vilosidades intestinais, evitando a livre fixação destes, protegendo estas vilosidades e a superfície absorptiva de toxinas irritantes causadas pelas bactérias patogênicas.

2.2.2 Estímulo ao sistema imune

Os probióticos, sobretudo, na nutrição de leitões destacam-se como estimuladores do sistema imunológico, através do suporte prestado à imunidade local da mucosa intestinal, aumentando a atividade dos macrófagos, reforçando a resposta imune e conseqüentemente estimulando a produção de anticorpos. Segundo Ferreira e Astolfi-Ferrera (2006) as bactérias probióticas têm a habilidade de modulação de respostas imunes sistêmicas aumentando não somente o número como também a atividade de células fagocíticas do hospedeiro.

Neste contexto, Menten (2001) observou que alguns gêneros de bactérias intestinais, como os *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium*, estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune, por meio do aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon. De acordo com Delcenserie et al. (2008),

os lactobacilos também podem modular a resposta imune intestinal através do estímulo de secreção de citocinas determinadas por células epiteliais.

A concentração de IgA em leitões é importante, sobretudo, na fase de creche onde estes apresentam um nível muito limitado de IgA intestinal, sendo a presença desta imunoglobulina essencial no auxílio ao controle da invasão bacteriana, neutralização e aglutinação de antígenos particulados (USHIDA et al., 2008).

Mizumachi et al. (2009) avaliando a adição de *Lactobacillus plantarum* LQ 80 na dieta de leitões desmamados, observaram que a IgM sérica e os níveis de anticorpos IgG dos leitões do tratamento com probiótico foram significativamente maiores em relação a dieta sem probiótico. No entanto, não observaram alterações nos níveis de IgA.

2.2.3 Efeito nutricional

A competição por nutrientes no lúmen intestinal acontece entre as bactérias intestinais por nutrientes específicos. Segundo Silva e Alves Filho (2000) a carência de nutrientes disponíveis é um fator limitante na manutenção das bactérias patogênicas, apresentando redução considerável de algumas espécies de bactérias na microbiota intestinal justamente pela deficiência nutricional.

Os probióticos influenciam na permeabilidade do epitélio intestinal, proporcionando maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes (ROTH, 2000). De acordo com Guillot (2000) os probióticos além de protegerem o epitélio intestinal, evitam que os patógenos utilizem aminoácidos, minerais e carboidratos para fermentação e produção de toxinas, contribuindo para a eficiência alimentar e o desempenho dos animais.

Junqueira et al. (2009) observaram que leitões alimentados com rações contendo probiótico, prebiótico ou simbiótico apresentaram melhor ganho de peso em relação ao tratamento controle ou com antibiótico no período de 42 a 71 dias de idade, reforçando a tese de que os probióticos e prebióticos atuam no desenvolvimento gastrointestinal, contribuindo para uma melhor digestão e absorção dos nutrientes.

2.2.4 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas

De acordo com Petri (2000), as bactérias probióticas podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio que possuem ação bacteriana principalmente em relação aos micro-organismos patogênicos. Os ácidos orgânicos, produzidos pelas bactérias lácticas são propiônico, acético, butírico e láctico, além de acetaldeído, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e aminas, que favorecem os probióticos na competição pelos sítios de fixação na mucosa intestinal (FLEMMING, 2005).

Utyama (2004) e Flemming (2005) fazem referência às bacteriocinas como sendo compostos protéicos com ação inibitória ou destrutiva contra uma espécie ou cepa específica de bactéria. Corroborando Silva (2006), cita que as bacteriocinas funcionam como antibióticos com ação local, agindo sobre o crescimento de patógenos intestinais.

As bacteriocinas produzidas pelos micro-organismos acidolácticos são a nicina, diplococcina, lactocidina e reuterina, essas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas, dentre elas podem ser citadas a *Salmonella sp*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp* (FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006).

Petri (2000) cita que as bactérias probióticas além da barreira física e efeito biológico, proporcionam também efeito químico, pois produzem ácidos orgânicos como láctico e propiônico, os quais levam a uma redução do pH do ambiente intestinal, com uma consequente inibição de bactérias patogênicas, principalmente em relação ao *Campylobacter*, *Clostridium* e *Salmonelas*.

Strompfová et al. (2006) ao fornecerem por via oral *Enterococcus faecium* para leitões durante os primeiros sete dias de idade, observaram que as concentrações de ácido láctico e propiônico foram significativamente maiores no conteúdo do cólon, e o pH do duodeno foi significativamente menor nos animais do tratamento com probiótico sete dias após o término da administração. Observaram ainda menor concentração de *Escherichia coli* e maior concentração de *Enterococcus faecium* aos sete dias de lactação, relatando que os ácidos orgânicos podem apresentar uma eficiente barreira inibindo a adesão de patógenos na mucosa intestinal.

2.3 Micro-organismos probióticos inativados

A capacidade de adesão dos micro-organismos probióticos na mucosa intestinal é fundamental para que os efeitos probióticos sejam observados, sendo considerada um pré-requisito para a colonização, atividade antagônica contra enteropatógenos e modulação do sistema imune. No entanto, tratamentos físicos destinados a inativação desses micro-organismos podem alterar a capacidade de adesão, podendo afetar a eficácia dos probióticos, principalmente as propriedades imunomoduladoras (KATO et al., 1994). Isso ocorre possivelmente pelas mudanças no envoltório celular das cepas inativadas e não ao fato de que elas estão mortas (OUWEHAND et al., 2000).

De acordo com o autor acima citado quando o probiótico é inativado por calor ou irradiação gama ocorre redução no número de cepas aderidas, entretanto o *Propionibacterium freudenreichii*, quando é inativado pelo calor pode ter sua capacidade de adesão aumentada, o mesmo acontece com o *Lactobacillus casei Shirota* quando inativado por irradiação gama.

Bernardeau et al. (2008a) ao estudarem o potencial de adesão “*in vitro*” de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus farciminis* inativadas pelo calor observaram que estes possuíam capacidade de aderir ao modelo de mucosa estudado. Os autores relataram também que os lactobacilos inativados podem melhorar a resposta dos animais à pressão de patógenos entéricos, criando um efeito de barreira e estimulando respostas imunológicas devido a estabilidade das cepas inativadas e a preservação das estruturas da parede celular.

Em outro trabalho realizado por Bernardeau et al. (2008b) ao avaliarem a eficácia de um programa preventivo baseado na suplementação de cepas inativadas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus farciminis*, na dieta de fêmeas suínas como continuação do tratamento curativo com antibiótico sobre a recorrência de diarreia, observaram que a suplementação de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus farciminis* permitiu controlar a diarreia dos animais durante o período experimental.

2.4 Microbiota do trato gastrointestinal dos leitões

O trato gastrointestinal dos suínos abriga uma microbiota densa e metabolicamente ativa composta principalmente por bactérias. O efeito da microbiota e suas atividades metabólicas requerem uma consideração especial quando visto no contexto da produção animal em que o crescimento eficiente do animal é o objetivo principal.

A microbiota intestinal é composta de inúmeras espécies bacterianas, constituindo um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, bioquímicos e fisiológicos do hospedeiro (SILVA e ALVES FILHO, 2000). Segundo Silva e Nörnberg, (2003), estima-se que 90% da área do intestino de um animal adulto seja habitada por mais de 400 espécies diferentes de micro-organismos, o que representa 10 vezes mais bactérias no trato digestivo do que células no corpo do hospedeiro.

As bactérias que colonizam o intestino no início da vida tendem a persistir ao longo da vida do animal, passando a compor a microbiota intestinal, que sofre influência ambiental. A formação desta microbiota se dá logo após o nascimento e aumenta durante as primeiras semanas de vida, até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbias (FLEMMING e FREITAS, 2005).

No leitão inicialmente desenvolvem-se espécies patogênicas de *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium*, e baixo desenvolvimento de *Lactobacillus*, devido ao trato gastrointestinal não possuir secreção de ácido clorídrico nas primeiras horas de vida. No entanto, com a ingestão contínua de leite durante a lactação, contendo lactose, o pH estomacal reduz gradativamente proporcionando condições para o crescimento de micro-organismos benéficos como *Lactobacillus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus termophilus* (SANCHES, 2004). As bactérias benéficas uma vez estabilizada no intestino, e em condições adequadas para a colonização e manutenção como temperatura, pH adequado e oferta de substrato, a microbiota auxilia o animal a resistir às infecções que possam surgir no trato digestório (SANTOS e TURNES, 2005).

Segundo Moraes e Neto (2003) a secreção ácida gástrica e as secreções digestivas do intestino delgado, pancreática e biliar são consideradas um dos principais fatores na regulação da microbiota intestinal por suprimir parte das bactérias ingeridas.

Diversos fatores podem afetar a estabilidade da população microbiana no trato gastrointestinal, entre eles a diversidade de micro-organismos, a qual aumenta com a idade, e devido a esta baixa diversidade de micro-organismos intestinais, os animais jovens são mais suscetíveis a distúrbios entéricos, pois onde há grande número de espécies bacterianas em equilíbrio existe maior capacidade da microbiota se opôr a pequenas mudanças. A diversidade de nutrientes também influi no equilíbrio microbiano uma vez que cada micro-organismo desenvolve-se melhor com determinadas fontes de nutrientes (LODDI, 2001).

O estresse também pode interferir na estabilidade normal da microbiota intestinal, visto que um animal estressado tem sua microbiota benéfica reduzida, devido, possivelmente,

a uma queda no nível de substrato para o seu crescimento. A diarreia algumas vezes pode ser uma expressão do estresse que o animal vem sendo submetido, ficando evidente que o equilíbrio da microbiota intestinal, reflete de maneira direta o bom estado de saúde do hospedeiro (GONZALES, 2004).

Pieper et al. (2010) observou em leitões desafiados oralmente com *Escherichia coli* e submetidos à administração de *Lactobacillus plantarum* redução na incidência de diarreia aos 39 dias de idade e o uso de *Lactobacillus plantarum* ao desmame aumentou a diversidade microbiana intestinal. Os autores explicaram os efeitos benéficos sobre a saúde intestinal através da relação entre diversidade dos ecossistemas e a capacidade de resposta às alterações.

A aderência à mucosa intestinal parece ser o mecanismo chave da colonização das bactérias patogênicas e seus efeitos nocivos sobre a saúde intestinal, assim processos que interferem na aderência dessas bactérias à mucosa são eficazes em reduzir a colonização do trato gastrointestinal por patógenos (FREITAS, 2008).

2.5 Características Hematológicas

O sangue é um tecido líquido do tipo conjuntivo, que está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos (KALASHNIKOVA, 1976), composto por duas fases: líquida (soro ou plasma), que representa 90% de água, 7% de proteínas (globulinas e albumina) e 3% de eletrólitos e sólida que é formada pelos glóbulos vermelhos (hemácias) e glóbulos brancos, constituídos de monócitos, linfócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos. O plasma tem como função o transporte de substâncias e anticorpos produzidos pelos plasmócitos e regulação osmótica entre o sangue e o líquido dos tecidos (FELDMAN et al., 2000).

As hemácias maduras são as células mais numerosas do sangue, e tem como função o transporte de oxigênio e gás carbônico, função esta desempenhada pela hemoglobina. Os parâmetros relativos às células vermelhas permitem identificar os processos referentes à anemia, enquanto o leucograma pode ser empregado no diagnóstico dos processos infecciosos e outras situações de desequilíbrio do sistema imune (MAHONEY e MCNULTY, 1992), sendo a contagem diferencial de leucócitos o método que permite conhecer a porcentagem dos tipos de células existentes no sangue (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

De maneira geral, a contagem de hemácias, o teor de hemoglobina e o hematócrito são maiores ao nascimento e diminui rapidamente. Este declínio nos valores de hemácias na

primeira semana de vida está relacionado à rápida expansão do volume plasmático induzida pelo consumo do colostro, destruição de eritrócitos fetais e suprimento inadequado de ferro para a síntese de hemoglobina (JAIN, 1993).

Para manter a hemostasia, os capilares necessitam da presença e o funcionamento normal das plaquetas, responsáveis pela hemostasia primária, que visa evitar hemorragias (GARCIA-NAVARRO et al., 1998).

Os leucócitos são constituídos por diferentes células denominadas linfócitos, neutrófilos ou segmentados, monócitos, eosinófilos e basófilos, todos desempenham funções ligadas ao sistema imune. Os leucócitos participam ativamente nos processos inflamatório e imunológico e como principal função os glóbulos brancos atuam na defesa do organismo contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetram nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os neutrófilos representam a primeira defesa contra os micro-organismos, sendo células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções. Os eosinófilos são encontrados nas inflamações subagudas ou relativas a fenômenos alérgicos, infecções parasitárias e em alguns processos neoplásicos; também possuem capacidade de fagocitose, mas menor que os neutrófilos (LATIMER et al., 2003). Os basófilos são células que participam principalmente dos processos alérgicos (LORENZI, 1999).

Os monócitos são os maiores leucócitos circulantes, representando de 4 a 8% dos leucócitos ativos (SHINOHARA, 2005). Os linfócitos produzem anticorpos por modularem-se em plasmócitos e estão relacionados aos processos inflamatórios e rejeição (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

O perfil leucocitário é particularmente avaliado porque os leucócitos são alterados por situações estressantes e podem ser diretamente relacionados com hormônios do estresse. As mudanças causadas pelo estresse ou tratamento com glicocorticóides aumentam o número de neutrófilos e reduzem o número de linfócitos (DAVIS et al., 2004).

2.6 Sistema imunológico e produção de IgA

Sobre o trato gastrointestinal dois sistemas responsáveis pela defesa imunológica são atuantes, um representado pela imunidade sistêmica e outro pela imunidade das mucosas. Segundo Goddeeris et al. (2002) estes sistemas consistem de tecidos linfóides e de células distribuídas ao longo do trato gastrointestinal. A defesa imunológica intestinal depende da

coordenação entre enterócitos e células do sistema imunológico, os linfócitos T e B, macrófagos, eosinófilos, e neutrófilos que compõem a lâmina própria da mucosa (CARVALHO, COLLARES-BUZATO, 2005).

Uma ampla variedade de células, mediadores químicos (citocinas e quimiocinas) e as imunoglobulinas estão envolvidos na resposta imunológica. Dentre os tipos celulares, os linfócitos e células apresentadoras envolvidas de antígenos, destacam-se por desempenharem funções primordiais nas respostas ao sistema imune.

Os linfócitos são subdivididos em linfócitos T e B, as células T são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno e por estimular células via mediadores químicos, o ataque direto pelas células T citotóxicas a células infectadas ou neoplásicas. Os linfócitos B têm como principal função a diferenciação em plasmócitos, e, por conseguinte, a síntese de imunoglobulinas. As imunoglobulinas são os principais componentes solúveis de interações com antígenos do sistema imune (KAMIMURA, 2006).

Deste modo, de acordo com Xavier et al. (2006), o desenvolvimento da imunidade sistêmica dos leitões ocorre através de imunidade passiva, após a ingestão de colostro e, conseqüentemente de imunoglobulinas do tipo IgG, IgM e IgA. Devido a permeabilidade do intestino à passagem de imunoglobulinas diminui progressivamente com o passar das horas, em função do fechamento das vilosidades intestinais com cerca de 48 horas após o nascimento (BLECHA, 1998; XAVIER et al., 2006).

Blecha, (1998) cita que após o segundo dia de vida dos leitões a concentração de IgG no sangue diminui sendo sua ação substituída pelas IgA provenientes do leite materno, proporcionando imunidade local. Segundo Pinheiro (2005) por ser mais resistente a degradação intestinal, a IgA torna-se a imunoglobulina mais atuante a partir do 3º dia de lactação, persistindo até o final desta, sendo ainda importante para a prevenção de doenças gastrointestinais em leitões.

As IgA são secretadas de maneira contínua pela glândula mamária, sendo também secretadas pelo trato digestivo, urogenital e respiratório, resistindo a degradação proteolítica e proporcionando prevenção à aderência das fímbrias bacterianas e alguns tipos de vírus à parede intestinal e posterior penetração nas células epiteliais (KELLY e COUTTS, 2000).

Cerca de 70 a 80% das células produtoras de imunoglobulinas estão localizadas no trato gastrointestinal, e mais de 60% da produção diária total de imunoglobulinas são de IgA intestinal (SALMINEM, 1998, BENGMARK, 2002). A IgA intestinal ou a IgA secretória é produzida por células da mucosa intestinal, e tem importância fundamental no intestino contra bactérias e vírus. O principal modo de ação da IgA é evitar a aderência de bactérias às

superfícies da mucosa determinando a sua simples passagem pela luz intestinal (BENGMARK, 2002).

Segundo Morais e Neto (2003), a IgA secretada na mucosa entérica é o principal anticorpo do intestino, com a capacidade de impedir a aderência de micro-organismos à superfície dos enterócitos. Esta IgA secretora se diferencia da IgA sérica por apresentar-se na configuração de dímeros formados pela parte secretora para conferir resistência contra a proteólise na luz intestinal

A IgA secretora é resistente as enzimas tripsina, quimiotripsina e papaína. Sua função primária na superfície da mucosa intestinal consiste em bloquear a adesão de bactérias enteropatogênicas aos enterócitos, como também metabolizar as enterotoxinas bacterianas e os vírus. Além da ação aglutinante sobre as bactérias patogênicas favorecendo a eliminação destas através do peristaltismo intestinal e, conseqüentemente, combate a colibacilose em suínos, com auxílio de outras células de defesa como os leucócitos, monócitos, macrófagos e linfócitos no intestino (SALMON, 1999).

2.7 Referências

- ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; et al. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 403-412, 2003.
- BALLONGUE, J. Bifidobacteria and probiotic action. In: Salimen S, von Wright A, Ouwehand A, **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3 ed, Marcel Dekker, p. 103-111, 2004.
- BAUER, E.; WILLIAMS B. A; SMIDT H.; et al. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. **Curr Issues Intest Microbiol**, v. 7, p. 35-51, 2006.
- BENGMARK S. Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for prebiotics, probiotics, and synbiotics? **Current Opinion Critical Care**, v.8, p. 145-151, 2002.
- BERNARDEAU, M.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. In vitro evaluation of probiotic potential of two heat-inactivated Lactobacilli cells for animal feed supplementation. Proceedings of the 20th **IPVS Congress**, Durban, South Africa, 2008a.
- BERNARDEAU, M.; GUILMOTO, H. Diet supplementation with fermentative heat-inactivated Lactobacilli based product can help to prevent swine dysentery in pigs. Proceedings of the 20th **IPVS Congress**, Durban, South Africa, 2008b.

- BLECHA, F. Immunological aspects: comparison with other species. In: The lactating sow. Editores: Verstegen, M.W.A.; Moughan, P.J.; Schrama, J.W. **Wageningen Pers**, Holanda, p.23-40, 1998.
- BURITI, F.C.A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2005.
- BUTOLO, J.E. Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. 2001, Campinas-SP. **Anais...** Campinas-SP: CBNA, p.295-305, 2001.
- CARDOZO, E. C. **Utilização de probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- CARVALHO, H. F. & COLLARES-BUZATO, C. B. 2005. Células: uma abordagem multidisciplinar. Ed. Manole, 2005.
- COCONIER, M.H., BERNET, M.F.; CHAUVIÉRE, G.; et al. Adhering heatkilled human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v.11, p.235-242, 1993.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.34, n.4, p.245-253, 2002.
- DAVIS, A.K.; COOK, K.C.; ALTIZER, S. Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. **Ecohealth**, New York, v.1, p.362-373, 2004.
- DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 10, p. 37–54, 2008.
- FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food** London, Ontario, Canada, 2002.
- FELDMAN B.F., ZINKL J.G.; JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 787p, 2000.
- FERNANDES, P.C.C.; LADEIRA, I.Q.; FERREIRA, C.L.L.F.; et. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.31, p 53-71, 2000.
- FERREIRA, A.P.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó, 2006, **Anais...** Chapecó, p.56-66, 2006.

- FERREIRA, C. L. L. F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. In: PORTUGAL et al. O agronegócio do leite e os alimentos funcionais. **Epamig**, Juiz de Fora, p. 181-203, 2001.
- FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação de efeito de prebiótico (MOS), probióticos (*Bacillus lecheniformes* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.
- FREITAS, C.M. **Efeito da administração de bactérias ácido-láticas sobre o ganho de peso de leitões na maternidade**. 2008. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2008.
- FREITAS, C.M. **Efeito da administração de bactérias ácido-láticas sobre o ganho de peso de leitões na maternidade**. 2008. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2008.
- GARCIA-NAVARRO C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1ª Ed., São Paulo, 169 p, 1998.
- GHADBAN, G.S. Probiotics in Broiler production- a review. **Arch.Geflugelk**, v.66, n.2, p.49-58, 2002.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. **Journal Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.
- GODDEERIS, B.M.; BOERSMA, W.J.A.; COX. E.; et al. “Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract in Poultry” **Wageningen Academic Publishers**, p 97 – 134, 2002.
- GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP. Jaboticabal, 2004.
- GUILLOT, J.F. The pros and cons of probiotics – make probiotics work poultry. **Feed Mix**, v.23, n.8, p.28-30, 2000.
- GUPTA V.; GARG R. Probiotics. **Indian J Med Microbiol**, v.27, p. 202-209, 2009.
- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2004, 433p.
- JUNQUEIRA, O.M.; BARBOSA, L.C.G.S.; PEREIRA, A.A.; et al. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2394-2400, 2009.

- KALASHNIKOVA, E. T. On the classification of morfological elements in the blood of fish. **Journal of Applied Ichthyology**, Bethesda, v.3, n.16, p.459-472, 1976.
- KAMIMURA, R.; ARANTES, V.M.; BELETTI, M.E.; et al. Efeitos de mananoligossacarídeo e colistina sobre a histomorfometria intestinal e níveis de IgA e IgG séricas em leitões. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 153-160, 2006.
- KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 16, p. 29-, 36, 1994.
- KELLY, D.; COUTTS, A.G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**, v.66, p 161-167, 2000.
- KONSTANTINOV, S.R.; SMIDT, H.; AKKERMANS, A.D.L.; et al. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 66, p.599-607, 2008.
- LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology**. 4.ed. Iowa: Iowa State Press. 448p, 2003.
- LODDI, M.M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista CFMV Suplemento Técnico**, Brasília, n.23, 2001.
- LORENÇON, L.; NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; et al. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.29, n.2, p 151-158, 2007.
- LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. São Paulo, MDSI, 641p, 1999.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO, Santos, 2005. **Anais...** Santos: FACTA, p 53-68, 2005.
- MAHONEY, J.B., MCNULTY, J.K. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. **Transactions of the American Fisheries Society**, Grosvenor Lane, 121: 261-268, 1992.
- MENTEN J.F.M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2002, Uberlândia, Minas Gerais, **Anais...** Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 251-276, 2002.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p 141-157, 2001.
- MIZUMACHI, K.; AOKI, R.; OHMORI, H.; et al. Effect of fermented liquid diet prepared with *Lactobacillus plantarum* LQ80 on the immune response in weaning pigs. **The Animal Consortium**, v.3, p 670-676, 2009.

- MORAIS M. B.; NETO U. F. Enteropatia Ambiental. **Revista Estudos Avançados da USP**, São Paulo, v. 48, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Swine Nutrition. Committee on Animal Nutrition. **Nutrient Requirements of Swine**. 10 ed. Washington: National Academy Press, 189p, 1998.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. **Revista Ciência Hoje**, v.28, p.34-38, 2000.
- O'TOOLE, P.W.; COONEY, J.C. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 9p, 2008.
- OUWEHAND, A.C.; TOLKKO, S.; KULMALA, J.; et al. Adhesion of inactivated probiótico strains to intestinal mucus. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.31, p.82-86, 2000.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; et al. Efeito do uso de probióticos e/ou prebióticos sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte . In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004 **Anais...** Santos-SP: APINCO, p 18, 2004.
- PETRI, R. Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil. II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria-RS, **Anais...** 2000.
- PIEPER, R.; JANCZYK, P.; URUBSCHUROV, V. Effect of Lactobacillus plantarum on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic Escherichia coli challenge in weaning piglets. **Livestock Science**, v.133, p.98-100, 2010.
- PINHEIRO, F.M.L. **Estudo sobre fontes de proteína de origem animal e vegetal em dietas para leitões no período de creche**. 2005, Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, 2005.
- QUINIOU N.; DAGORN J.; GAUDRÉ D. Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. **Livestock Production Science**, v.78, p. 63-70, 2002.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., SILVA-SOUZA, A. Hematologia de peixes Brasileiros In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Varela, São Paulo, p. 89-120, 2004.
- RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, D. A.O.; TAKETOMI, E.A.; et al. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morphology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.6, 2007.
- ROSS, G.R.; GUSILS, C.; OLISZEWSKI, R.; et al. Effects of probiotic in swine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, n.6, p.545-549, 2010.

- ROTH, L. The battle of the bugs the direct fed microbial concept. **Pig Progress**, v.16, p 12-15, 2000.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, n.5-6, p.563-572, 1998.
- SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 143-155, 1999.
- SANCHES, A.L. **Probiótico, Prebiótico e Simbiótico em ração de leitões ao desmame**. 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2004.
- SANTOS, J.R.G.; TURNES, C.G. Probióticos em Avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.741-747, 2005.
- SHIM, S.B. **Effects of prebiotics, probiotics and symbiotic in the diet of young pigs**. 2005, 179 p, P.H.D Tese (PhD in Animal Nutrition Group) Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda, NL, 2005.
- SHINOHARA, E. M. G. **Células Sanguíneas**. Disponível em: < <http://www.fcf.usp.br>>. Acessado em: 05 de abril de 2011.
- SILVA, C.A.; HOSHI, E.H.; PACHECO, G.D.; et al. Avaliação de probiótico (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho de leitões. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.1, p 133-140, 2006.
- SILVA, E.N; ALVES FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria, RS. **Anais...** 2000.
- SILVA, L.P.; NORBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p 983-990, 2003.
- STROMPFOVÁ, V. MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; et al. *Enterococcus faecium* EK13-anenterosin strain with A- producing probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**, v.12, p.242-248, 2006.
- TARAS, D.; VAHJEN, W.; MACHA, M.; et al. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes and piglets during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows. **Journal of Animal Science**, v.84, p. 608-617, 2006.
- THOMAZ, M.C.; HANNAS, M.I.; TUCC, F.M.; et al. Diferentes fontes proteicas em rações de leitões sobre atividade da tripsina e parâmetros sanguíneos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 112-121, 2009.
- USHIDA K, KAMEUE C, TSUKAHARA T, et al. Decreasing traits of fecal immunoglobulin A in neonatal and weaning piglets. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.8, p. 849-852, 2008.

UTIYAMA, C.E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de leitões recém-desmamados**. 2004. 110f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2004.

WILLING, B.P.; VAN KESSEL, A.G. Enterocyte proliferation and apoptosis in the distal small intestine is influenced by the composition of colonising commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3256-3266, 2007.

XAVIER E.G.; RUTZ F.; ROLL V.F.B. 2006. Imunonutrientes na produção de suínos. In: **Anais...** 1º Simpósio UFRGS sobre Produção, Reprodução e Sanidade Suína. Porto Alegre, Brasil-RS. p.174-195.

YAMANAKA, T. et al. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle associated epithelium of Peyer's patches. **Journal of Immunology**, v.170, p.816-822, 2003.

3 ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO COM CÉLULAS VIÁVEIS E INATIVADAS PARA LEITÕES NA FASE DE ALEITAMENTO E CRECHE

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo avaliar o uso oral de probióticos com células viáveis e inativadas (“pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum* de origem suína), sobre a microbiota intestinal e o desempenho de leitões do nascimento aos 35 dias de idade. Foram utilizados, na fase de aleitamento, 108 leitões, e para a fase de creche 72 leitões com 21 dias de idade, distribuídos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram os seguintes: tratamento A: 1 ml de caldo MRS + 1 ml de solução salina estéril; tratamento B: 1 ml de probiótico ($8,60 \times 10^7$ UFC/ml de um “pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum*) ativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina; tratamento C: 1 ml de probiótico contendo células inativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina. As contagens de bactérias acidoláticas e coliformes não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos e tempos. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos para ganho de peso e ganho diário de peso dos leitões do nascimento aos 21 dias de idade. Dos 21 aos 35 dias de idade, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre o tratamento controle e os tratamentos probióticos com células viáveis ou inativadas, nas variáveis pesos médios e conversão alimentar. Observou-se diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos para consumo de ração, consumo diário de ração, ganho de peso e ganho diário de peso. O tratamento probiótico de células inativadas aumentou o ganho de peso e ganho diário de peso dos leitões dos 21 aos 35 dias de idade quando comparado ao tratamento controle e o uso oral de probiótico com células viáveis e inativadas não alterou as contagens microbiológicas das fezes de leitões do nascimento aos 35 dias de idade.

Palavras-chave: coliformes, desempenho, lactobacilos, micro-organismos

ORAL ADMINISTRATION OF PROBIOTICS WITH VIABLE CELLS AND INACTIVATED TO PIGLETS THE LACTATING PHASE AND NURSERY

ABSTRACT: The objective was to evaluate the use oral probiotic of with viable cells and inactivated ("pool" of *Lactobacillus sp.* and *Lactobacillus plantarum* of gastrointestinal origin of pigs), on performance, intestinal microbiota and the immune system of piglets during the stages of lactation and creche. Were used, 108 lactating piglets and for nursery phase 72 piglets weaned at 21 days old, divided into an experimental design of randomized blocks with three treatments and six replicates The treatments were: Treatment A: 1 ml of MRS broth + 1 ml of sterile saline, treatment B: 1 ml of probiotic (8.60×10^7 CFU / ml of a "pool" of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sp.*) activated MRS broth + 1 ml of saline, treatment C: 1 ml of probiotic inactivated cells in MRS broth + 1 ml of saline. Treatments were administered orally to piglets in the daily morning, from birth to 35 days of age with 1 ml per animal lactating and 2 ml in the nursery phase. The counts of acidoláticas bacteria, and coliforms were not affected ($P > 0.05$) by the treatments and times. There was no effect ($P > 0.05$) of treatments for weight gain and daily weight gain of piglets from birth to 21 days old. From 21 to 35 days of age, no significant difference ($P > 0.05$) between control treatment and probiotics treatments with viable or inactivated cells, in variables average weights and feed conversion. Difference was observed ($P < 0.05$) among treatments for feed intake, daily feed intake, weight gain and daily weight gain. Treatment probiotic of cells inactivated increased the weight gain and daily weight gain of piglets from 21 to 35 days of age when compared to the control treatment, and the use of oral probiotic with viable and inactivated cells did not alter the microbiological counts of the faeces of piglets birth to 35 days old.

Key words: coliforms, lactobacilli, micro-organisms, performance

3.1 Introdução

A suinocultura é considerada como uma das mais importantes atividades na cadeia alimentar da população humana. A produção brasileira, em 2010 teve um acréscimo de 1,5 % em relação a 2009, passando de 3,19 para 3,24 milhões de toneladas (ABIPECS 2010), essa consolidação da suinocultura no agronegócio brasileiro está diretamente ligada a tecnificação da cadeia produtiva que visa alcançar melhores índices de produtividade, menor custo de produção e qualidade dos produtos.

As fases de aleitamento e creche, etapas básicas para a produção economicamente viável, são as fases em que os leitões encontram-se mais predispostos a vários fatores estressantes, entre os desafios relacionados ao desmame dos leitões destacam-se a transição da dieta, limitação do consumo e o estresse sócio-ambiental.

O estresse pode causar desequilíbrio na microbiota intestinal por aumentar a liberação de corticosteróides, que reduzem a quantidade de mucina (CARDOZO, 2006), e torna o trato gastrintestinal do leitão predisposto a colonização de micro-organismos patogênicos. Além do complexo de enfermidades digestivas que podem afetar os animais tais como a diarreia, uma vez que, contrário aos animais que estão em fase de crescimento, estes têm uma população microbiana menos estável e definida (GÓMEZ, 2006), estas alterações provocam quedas nos parâmetros de desempenho animal.

De acordo com Silva Jr (2009), a microbiota bacteriana influencia fortemente o estado nutricional do animal devido às suas relações com as funções do trato gastrointestinal, como as interações e efeitos no epitélio intestinal, nos nutrientes, enzimas e sais biliares, e no sistema imune da mucosa intestinal.

A fim de proteger os leitões lactentes e os leitões desmamados dos distúrbios gastrintestinais, são utilizados antimicrobianos promotores de crescimento com a função de auxiliar o equilíbrio da microbiota intestinal dos leitões (UTIYAMA, 2004). Entretanto, acredita-se que o uso indiscriminado de antimicrobianos na ração resulta em resistência bacteriana e em resíduos nas carnes.

Neste sentido, visando atender o mercado consumidor que cada vez mais exige alimentos seguros e de qualidade, tem-se buscado alternativas ao uso de antimicrobianos como os probióticos, definidos por Sanders (2003) como micro-organismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Uma grande variedade de micro-organismos tem sido utilizados como probióticos, entre estes, espécies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Streptococcus e algumas leveduras como *Saccharomyces*, sendo que os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* demonstram potencial como probiótico tanto para a alimentação humana, quanto para a nutrição animal, produzindo efeitos benéficos para o hospedeiro (COLLINS e GIBSON, 1999).

Para Broom et al. (2006), as preparações probióticas geralmente consistem na viabilidade de produção de bactérias ácido lácticas de origem intestinal, que no ambiente gastrintestinal ajudam a restabelecer ou manter uma microbiota intestinal benéfica, evitando assim, transtornos digestivos e melhorando o desempenho dos animais

Para tanto, muitos mecanismos foram sugeridos sobre o modo de ação dos probióticos, um deles consiste no princípio da exclusão competitiva. Segundo Benno (2001), os microorganismos que compõem as formulações dos probióticos instalam-se na parede intestinal através de mecanismos de exclusão competitiva, cuja principal característica consiste na competição com as bactérias patogênicas pelos substratos e pelos locais de adesão (Gardiner et al., 2004, Kos et al., 2003, Krause et al., 1995), além de reduzir o pH do intestino o que otimiza o crescimento de lactobacilos e inibe o crescimento de coliformes (SAKATA et al., 2003).

Os probióticos podem proporcionar o crescimento animal e reduzir o uso de antibióticos e outros medicamentos necessários para que o animal se mantenha em condição saudável (SANTOS e GIL-TURNES, 2005, WANG et al., 2007). Estes aditivos estão cada vez mais integrados a produção animal, e as respostas mais expressivas da administração dos mesmos são ressaltadas em animais em períodos de estresse e em recém nascidos ou desmamados.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso oral de probióticos com células viáveis e inativadas (“pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum* de origem gastrointestinal de suínos) sobre a microbiota intestinal e o desempenho de leitões do nascimento aos 35 dias de idade.

3.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em uma Unidade de Produção de Leitões com 730 matrizes, sendo a granja considerada de alto desafio sanitário, localizada em Nova Santa Rosa, região Oeste do Estado do Paraná. As análises laboratoriais foram realizadas no

Laboratório de Parâmetros Sanguíneos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná *Campus* Marechal Cândido Rondon/PR.

3.2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados, na fase de aleitamento, 108 leitões provenientes de 18 matrizes ao quarto parto, da linhagem Dalland. Foram utilizadas três salas de maternidade com celas de parição suspensas, dotadas de comedouro de concreto e bebedouro tipo chupeta para as matrizes, comedouros e bebedouros chupeta específicos e escamoteadores com lâmpada incandescente para os leitões. A ventilação e a temperatura dentro das salas de maternidade foram controladas através do fechamento e abertura de cortinas.

O peso médio inicial dos leitões foi de 1.410 gramas a partir do nascimento, sendo distribuídos em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. Cada unidade experimental foi representada por uma leitegada, utilizando-se os seis leitões mais próximos da média da mesma, estes foram identificados através de marcação na orelha direita. Durante o período experimental os leitões receberam as mesmas condições de manejo da granja.

Para a fase de creche foram utilizados 72 leitões com 21 dias de idade, com peso médio inicial de 5,47 Kg, distribuídos em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. A unidade experimental foi representada pela baia onde foram alojados quatro animais, sendo dois machos castrados e duas fêmeas. O peso individual inicial foi adotado como critério para a escolha dos animais, o qual deveria estar o mais próximo da média da leitegada.

Os animais foram alojados em um galpão de alvenaria com piso de concreto e telhas de cerâmica, dotado de baias suspensas, comedouros semi-automáticos, bebedouros tipo chupeta e piso de madeira vazado. A ventilação e a temperatura dentro da sala da creche foram controladas de acordo com a observação do conforto térmico dos animais, através da abertura e fechamento das cortinas.

Os tratamentos foram os seguintes:

Tratamento A: 1 ml de caldo MRS (de Mann; Rogosa; Sharpe, 1960) + 1 ml de solução salina estéril (soro fisiológico);

Tratamento B: 1 ml de probiótico ($8,60 \times 10^7$ UFC/ml de um “pool” de *Lactobacillus* sp e *Lactobacillus plantarum*) ativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina;

Tratamento C: 1 ml de probiótico contendo células inativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina.

Os tratamentos foram administrados via oral aos leitões diariamente no período da manhã, do nascimento aos 35 dias de idade, sendo 1 ml por leitão na fase de aleitamento conforme descrito por Correa et al. (2010) e 2 ml na fase de creche de acordo com Pieper et al. (2009).

3.2.2 Origem das cepas

As cepas de lactobacilos empregadas neste experimento foram isoladas das fezes de leitões e analisadas “*in vitro*” por Mangoni (2009).

3.2.3 Liofilização das cepas probióticas

As cepas selecionadas com características probióticas (MANGONI, 2009), foram reativadas através de três repicagens sucessivas em caldo MRS estéril e incubadas a 37°C por 18 horas (SANTOS 2003). Posteriormente foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o concentrado de células ressuscitado em água destilada estéril, procedendo-se posteriormente uma nova centrifugação, sendo o sobrenadante novamente descartado e o concentrado ressuscitado em LDR 14% (leite desnatado reconstituído), congeladas à -20 °C e liofilizadas (Liofilizador L 101, Liobrás, São Carlos, Brasil).

Foram liofilizadas 14 cepas de lactobacilos sendo que após a liofilização as amostras foram diluídas em água destilada esterilizada, obtendo-se uma diluição inicial de 1:10 com sucessivas diluições até 10^{-7} onde realizou-se a semeadura em ágar MRS para verificação da viabilidade celular.

As cepas foram avaliadas quanto à viabilidade celular durante um período de 30 dias e as mais resistentes ao processo de liofilização foram então empregadas nesta experimentação (Tabela 01).

Tabela 01. Viabilidade celular (UFC/ ml) de cepas de lactobacilos de origem gastrointestinal de suínos antes e após o processo de liofilização

Cepas	Antes da liofilização	Após liofilização
1	$1,14 \times 10^9$	$5,10 \times 10^6$
2	$2,49 \times 10^9$	$2,48 \times 10^5$
3	$3,05 \times 10^9$	$5,10 \times 10^8$
4	$2,40 \times 10^9$	$6,58 \times 10^8$
5	$1,04 \times 10^9$	$3,20 \times 10^2$
6	$1,29 \times 10^9$	$3,10 \times 10^7$
7	$2,80 \times 10^9$	$6,70 \times 10^3$
8	$1,49 \times 10^9$	$5,30 \times 10^3$
9	$1,01 \times 10^9$	$3,30 \times 10^7$
10	$1,95 \times 10^9$	$2,00 \times 10^7$
11	$6,90 \times 10^8$	$4,60 \times 10^6$
12	$1,85 \times 10^9$	$2,26 \times 10^4$
13	$1,67 \times 10^9$	$4,10 \times 10^5$
14	$6,50 \times 10^8$	$1,34 \times 10^3$

UFC/ ml - Unidade formadora de colônia/ ml

3.2.4 Manutenção e preparo das culturas probióticas

Antes do preparo de cada quantidade, as cepas foram descongeladas e reativadas através de três repicagens sucessivas em caldo MRS estéril e incubadas a 37°C por 18 horas (SANTOS, 2003).

O probiótico foi preparado a partir das culturas ativas, identificadas como L3, L4, L9 e L14, sendo estas submetidas a diversos testes, de compatibilidade, de resistência ao ácido clorídrico, tolerância aos sais biliares e fenol, hidrofobicidade e inibindo *Escherichia coli*. A L3 e L14 foram identificadas pela Fundação André Tosello, Campinas-SP como *Lactobacillus plantarum*; as mesmas foram inoculadas em caldo MRS estéril e incubadas a 37°C por 18 horas. (SANTOS, 2003). O probiótico foi envasado em recipientes estéreis e resfriado a 5°C, sendo verificada a viabilidade celular através da semeadura em ágar MRS durante o período de sete dias.

O probiótico inativado foi preparado seguindo a mesma metodologia, porém a inativação foi realizada pelo calor úmido, autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Para confirmação da inativação realizou-se a semeadura em ágar MRS.

3.2.5 Composição das rações

Os leitões receberam ração pré-desmame dos 10 aos 21 dias e pré-inicial I dos 21 aos 35 dias de idade (Tabela 02), sendo que as rações e a água foram fornecidas a vontade. As rações foram formuladas visando atender as exigências nutricionais dos animais, propostas por Rostagno et al. (2005).

Tabela 02. Composição centesimal das rações utilizadas para leitões dos 10 aos 21 e dos 21 aos 35 dias de idade

Ingredientes %	10 aos 21 dias de idade	21 aos 35 dias de idade
Milho	54, 565	54, 538
Farelo de soja	10, 605	14, 564
Soro de leite em pó	10, 107	10, 000
Leite em pó	5, 770	5, 890
Plasma <i>spray dried</i>	5, 000	4, 000
Açúcar	4, 000	3, 000
Farinha de peixe 54%	4, 000	3, 000
Fosfato bicálcico	1, 883	1, 267
Óleo/soja	1, 615	1, 550
L-lisina HCL	0, 713	0, 477
Óxido de zinco	0, 350	0, 350
Sal comum	0, 328	0, 234
Cloreto de colina (60%)	0, 200	0, 200
DL-metionina	0, 321	0, 195
L-treonina	0, 286	0, 142
Mistura vitamínica ²	0, 120	0, 120
L-triptofano	0, 076	0, 045
Mistura mineral ³	0, 040	0, 050
Calcário calcítico	0, 011	0, 368
Antioxidante ¹	0, 010	0, 010
Total	100, 000	100, 000
Composição Calculada⁴		
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3, 325	3, 324
Proteína bruta (%)	19, 997	20, 000
Lactose (%)	10, 017	10, 004
Cálcio (%)	0, 888	0, 825
Sódio (%)	0, 280	0, 230
Potássio (%)	0, 596	0, 657
Cloro (%)	0, 684	0, 612
Fósforo disponível (%)	0, 560	0, 449
Lisina digestível (%)	1, 520	1, 330
Metionina digestível (%)	0, 623	0, 502
Met+Cis. Digestível (%)	0, 851	0, 745
Treonina digestível (%)	0, 958	0, 837
Triptofano digestível (%)	0, 275	0, 253

¹BHT: Butil Hidroxitolueno; ²Conteúdo/kg: ferro 100g; cobalto 1g; manganês 40g; zinco 100g; iodo 1,5g; e veículo q.s.p 1000g. ³Conteúdo/kg: vit.A, 10.000.00 U.I.; vit.D₃, 1.5000.000 U.I.; vit.E, 30.000 U.I.; vit.B₂, 5,0 g; vit B₆, 3,0 g; vit.B₁₂ 30.000 mcg; ácido nicotínico 30.000 mcg; ácido pantotênico 12.000 mcg; vit.K₃ 2.000 mg; ácido fólico 800 mg; biotina 100 g e veículo q.s.p 1.000g. ⁴Valores obtidos de Rostagno et al.(2005).

3.2.6 Análises microbiológicas das amostras fecais

Aos 7, 21 e 35 dias de idade foram coletadas amostras fecais de um leitão com peso mais próximo da média da parcela de cada unidade experimental, por meio de massagem da porção terminal do abdomen, com a retirada das fezes diretamente do reto. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis e imediatamente transportadas ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da UNIOESTE.

As amostras foram preparadas e diluídas, adicionando 1,0 g de fezes em 99 ml de água destilada esterilizada; obtendo-se uma diluição inicial de 1:100, sendo posteriormente realizadas diluições sucessivas até 10^{-8} , onde realizou-se a semeadura nos meios específicos.

Para avaliação da flora acidolática, foi utilizado o ágar para lactobacilos, MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) e para coliformes, o VRB (Violet Red Bile Agar). As amostras diluídas até 10^{-8} e semeadas em duplicata foram incubadas em estufa BOD a uma temperatura controlada a 37°C por um período de incubação de 48 horas.

Após o período de incubação as colônias foram contadas, utilizando um contador de colônias “Quebec”, e os resultados obtidos expressos como log na base 10 da contagem por grama do peso líquido das fezes.

3.2.7 Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar dos leitões do nascimento aos 35 dias de idade

Durante o período experimental foi avaliado o desempenho dos leitões, do nascimento aos 21 dias de idade quanto ao ganho de peso (GP) e ganho diário de peso (GDP). Os resultados foram calculados a partir das pesagens dos animais ao nascimento e aos 21 dias de idade.

Dos 21 aos 35 dias de idade, avaliou-se o GDP, consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA). Os resultados foram calculados a partir das pesagens dos animais e da quantificação do total de ração consumida, no período de 21 a 35 dias.

3.2.8 Modelo experimental utilizado

O modelo experimental usado nas análises microbiológicas das fezes foi de parcelas subdivididas, com três tratamentos nas parcelas. As medições ao longo do tempo (7, 21 e 35 dias de idade) constituíram as subparcelas, tendo as análises estatísticas dos dados realizadas conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ij} + T'_k + TT'_{ik} + e_{ijk}$$

sendo que:

Y_{ijk} : observação referente ao i-ésimo tratamento, na j-ésima repetição, no k-ésimo tempo;

μ : média geral do experimento;

T_i : efeito do i-ésimo tratamento T;

e_{ij} : erro experimental associado ao i-ésimo tratamento T na j-ésima repetição;

T'_k : efeito do k-ésimo tempo T';

TT'_{ik} : efeito da interação entre o i-ésimo tratamento T com o k-ésimo tempo T';

e_{ijk} : erro experimental associado a ijk-ésima observação

As variáveis de desempenho do nascimento aos 21 e dos 21 aos 35 dias de idade, foram avaliadas através da análise de variância, de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + T_j + e_{ij}$$

sendo que:

Y_{ij} : observação referente ao i-ésimo tratamento no j-ésimo bloco;

μ : média geral do experimento;

B_i : efeito do i-ésimo bloco;

T_j : efeito do j-ésimo tratamento;

e_{ij} : erro experimental associado a ij-ésima observação

Os dados foram submetidos às análises estatísticas, utilizando o Statistical Analyses System (SAS, 2000) e como procedimento estatístico foi utilizado o teste de Tukey.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Desempenho dos leitões na fase de aleitamento e creche

Não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) entre o tratamento controle e os tratamentos com probiótico com células viáveis e inativadas para ganho de peso (GP) e ganho diário de peso (GDP), dos leitões do nascimento aos 21 dias de idade (Tabela 03). Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por Correa et al. (2010), que ao fornecerem probiótico oral composto por *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium pseudolongum* aos leitões, antes da ingestão do colostro, seis horas após ingestão do colostro, aos três dias de idade e dez dias de idade, não observaram diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos com relação ao ganho de peso na fase de aleitamento.

Tabela 03. Desempenho dos leitões dos grupos-controle, probiótico com células viáveis e inativadas na fase de aleitamento do nascimento aos 21 dias de idade

Parâmetros	Tratamentos			CV (%) ¹
	Controle	Ativo	Inativo	
GP (kg)	4, 207	4, 180	4, 433	23,07
GDP (g/dia)	200, 393	199, 000	211, 103	23,08

GP – Ganho de peso; GDP- Ganho Diário de Peso. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) ¹CV- coeficiente de variação

Esse mesmo comportamento foi observado por Freitas (2008), ao fornecer probiótico oral composto por *Bifidobacterium pseudolongum* e *Lactobacillus reuteri* antes do colostro e ao desmame, e por Gebert et al. (2011) ao avaliarem o uso de uma suplementação de leite, e uma suplementação de leite combinado com *Lactobacillus brevis*, ambos não observaram diferença entre os tratamentos na fase de aleitamento sobre o desempenho dos leitões.

Da mesma forma, Silva et al. (2010), avaliando o uso de probióticos e antibióticos para matrizes e três dietas para leitões antibióticos (Amoxicilina e Colistina), probiótico oral no 1, 3, 12 e 21 dias de idade ou associação antibiótico-probiótico, não observaram influência dos tratamentos no ganho de peso durante o aleitamento. No entanto, ao comparar os leitões alimentados com a associação antibiótico-probiótico, observaram maior ganho de peso aos 14 e 28 dias de idade nos leitões das matrizes que receberam probióticos.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho também foram encontrados por Moraes et al. (2009), ao fornecerem ou não suspensão oral de probiótico composto por *Enterococcus sp* e *Lactobacillus sp* nas primeiras 24 horas após o nascimento, não observaram diferenças significativas no ganho de peso e no peso ao desmame em relação ao

controle na fase de aleitamento. Os autores relataram que a ausência de efeito do uso de probióticos, pode estar relacionada à dose e a viabilidade do probiótico utilizado, bem como o fato do probiótico ter sido administrado somente para a leitegada, e não para a matriz, o que também pode ter ocorrido no presente trabalho.

No período de creche, dos 21 aos 35 dias de idade (Tabela 04), não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre o tratamento controle e os tratamentos com probióticos com células viáveis e células inativadas, nas variáveis peso médio (PM) e conversão alimentar (CA). No entanto, observou-se diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos para o consumo de ração (CR), consumo diário de ração (CDR), ganho de peso (GP) e ganho diário de peso (GDP).

Tabela 04. Desempenho dos leitões dos grupos-controle, probiótico com células viáveis e inativadas na fase de creche dos 21 aos 35 dias de idade

	Tratamentos			CV(%) ¹
	Controle	Ativo	Inativo	
PMI 21(kg)	5, 668	5, 645	5, 667	15,59
PM 35(kg)	7, 015	7, 418	7, 631	16,21
CR (kg)	2, 218 b	2, 745 a	2, 750 a	9,05
CDR (g/dia)	0, 158 b	0, 196 a	0, 196 a	9,05
GP (kg)	1, 399 b	1, 772 ab	2, 042 a	34,69
GDP (g/dia)	99,96 b	128,58 ab	146,00 a	11,83
CA	1, 709	1, 676	1, 415	26,74

PMI- Peso Médio Inicial; PM- Peso Médio final; CR- Consumo de Ração; CDR- Consumo Diário de Ração; GP- Ganho de Peso; GDP- Ganho Diário de Peso; CA- Conversão Alimentar. *Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem significativamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey a 5 % ¹CV- coeficiente de variação

O tratamento controle apresentou menor consumo de ração e menor consumo diário de ração ($P<0,05$) em relação aos tratamentos probióticos tanto com células viáveis como inativadas, apresentando também menor ($P<0,05$) ganho de peso e ganho diário de peso em relação ao tratamento probiótico com células inativadas. Não houve diferença ($P>0,05$) para o tratamento controle e probiótico com células viáveis e entre os tratamentos probióticos para ganho de peso e ganho diário de peso (Tabela 04).

O menor consumo de ração observado no tratamento controle pode estar relacionado ao estresse naturalmente presente neste período e a baixa ingestão de água pelos animais. O aumento observado no ganho de peso e no ganho diário de peso no tratamento probiótico com células inativadas pode ser atribuído a melhor absorção dos nutrientes em associação ao equilíbrio da microbiota intestinal.

Os resultados obtidos neste trabalho (Tabela 04) contrastam com os apresentados por Possamai (2010), que avaliou a inclusão de probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum* e prebiótico (inulina) em rações para leitões dos 21 aos 49 dias de idade, não observou influência ($P>0,05$) para ganho de peso, ganho diário de peso, conversão alimentar, consumo de ração e consumo diário de ração entre os tratamentos e níveis de inclusão.

Em relação ao peso final, os resultados deste trabalho (Tabela 04) concordam com o estudo de Ross et al. (2010), que ao fornecerem probiótico via oral a leitões dos 35 aos 70 dias de idade, não observaram diferenças significativas no peso final.

Resultados contrários aos encontrados neste trabalho (Tabela 04) foram demonstrados por Lessard et al. (2009), ao avaliarem o uso dos probióticos *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, e ambos *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae boulardii* administrados durante a fase de aleitamento por via oral, três vezes por semana para os leitões, e adicionados a ração ao desmame, e Matijasic et al. (2006), com a inclusão de *Lactobacillus gasseri* K7 e *Lactobacillus gasseri* LF221, para leitões dos 21 aos 42 dias de idade não observaram diferença entre os tratamentos probióticos e o controle para ganho médio diário e ganho de peso.

Da mesma maneira, Sanches et al. (2006) avaliando a inclusão de antibiótico, probiótico, prebiótico e simbiótico para leitões dos 23 aos 58 dias de idade, Santos et al. (2002) ao avaliarem *Lactobacillus sp* em dietas para leitões dos 21 aos 49 dias de idade, e Rao (2007) ao avaliar o uso de probiótico composto por *Lactobacillus plantarumcase* e *Lactobacillus salivaruscase* em leitões dos 21 aos 35 dias de idade, não observaram diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para o ganho diário de peso, consumo diário de ração, conversão alimentar.

Por outro lado, Lojanica et al. (2010), observaram que o uso de *Enterococcus faecium* mais acidificante, em leitões a partir do desmame melhorou a conversão alimentar, o ganho de peso e diminuiu a taxa de mortalidade ($P<0,01$). Resultado semelhante para o ganho de peso foi observado no presente trabalho (Tabela 04) onde o uso de probiótico com células inativadas apresentou melhor resultado em relação ao tratamento controle. Os autores relataram que as divergências entre as respostas para tratamentos com probiótico em suínos recém desmamados podem ser atribuídas a vários fatores, incluindo variações na idade, condições ambientais, estado de saúde, e o tipo de probiótico, o que também poderia explicar as diferenças entre os resultados encontrados no presente trabalho quando comparado a literatura.

Resultados positivos a suplementação com probióticos também foram relatados por Giang et al. (2010), que ao avaliarem três diferentes complexos probióticos, compreendendo combinações de *Enterococcus faecium* 6H2, *Lactobacillus acidophilus* C3, *Pediococcus pentosaceus* D7, *Lactobacillus plantarum* 1K8 e *Lactobacillus plantarum* 3K2, observaram aumento ($P < 0,05$) no consumo diário de ração e ganho de peso entre o grupo controle e a suplementação com probióticos; entre os diferentes complexos probióticos não foi observado diferença significativa ($P > 0,05$).

Rodrigues et al. (2007), ao estudarem o uso de probiótico com células inativadas composto por *Lactobacillus acidophilus* e probiótico com células viáveis composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum*, em leitões do nascimento aos 30 dias de idade, observaram que os animais que receberam probiótico com células viáveis apresentaram maior ($P < 0,05$) ganho de peso do que o grupo com células inativadas e o grupo controle. Os autores ressaltaram que a melhora no ganho de peso dos leitões que receberam probióticos, principalmente com células viáveis, pode ser atribuída ao equilíbrio entre a flora natural e os organismos patogênicos intestinais e também à melhor absorção dos nutrientes.

Guerra et al. (2007) observaram que o uso de antibiótico promoveu maior ganho de peso ($P < 0,01$) em leitões dos 21 aos 63 dias de idade, quando comparado ao uso dos probióticos *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei*, no entanto, a suplementação probiótica resultou em melhor peso corporal, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar ($P < 0,01$) do que o tratamento controle. Os autores relataram que um efeito mais pronunciado da suplementação probiótica sobre o desempenho dos leitões pode ser esperado em condições insatisfatórias de sanidade dos animais.

3.3.2 Contagens de bactérias acidoláticas e coliformes de fezes de leitões, na fase de aleitamento e creche

Os valores encontrados neste experimento em relação ao número de unidades formadoras de colônias de bactérias acidoláticas e coliformes, em leitões aos 7, 21 e 35 dias de idade, encontram-se na tabela 05.

Tabela 05. Número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) de bactérias acidoláticas e coliformes totais nas fezes de leitões em relação aos diferentes tratamentos e dias de coleta

	Tratamentos			CV(%) ¹
	Controle	Ativo	Inativo	
	Idade (dias)			
Micro-organismos	7			
Lactobacilos	9,26	9,45	9,76	4,91*
Coliformes	7,56	8,50	7,85	
	21			10,39**
Lactobacilos	8,78	8,44	8,62	
Coliformes	7,98	8,36	8,20	
	35			
Lactobacilos	8,93	9,00	8,79	
Coliformes	7,66	6,83	7,23	

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) ¹CV- coeficiente de variação, *- coeficiente de variação para lactobacilos, **- coeficiente de variação para coliformes

As contagens de bactérias acidoláticas e coliformes não foram influenciadas ($P>0,05$) pelos tratamentos. Não foi observada interação significativa ($P>0,05$) entre os diferentes dias de coleta e os tratamentos em relação ao número de unidades formadoras de colônias de bactérias acidoláticas e coliformes (Tabelas 05). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Santos et al. (2003), que ao utilizarem probiótico a base de *Lactobacillus sp* administrado oralmente a leitões do nascimento aos 49 dias de idade, não observaram diferença significativa para a concentração fecal de *Lactobacillus*, coliformes, *Clostridium* e *Enterococcus* aos 7, 28 e 49 dias de idade.

Da mesma maneira, Correa et al. (2010) com o uso de probiótico oral composto por *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium pseudolongum* a leitões, antes da ingestão do colostro, seis horas após ingestão do colostro, aos três e aos dez dias de idade, não observaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos para a colonização de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* aos sete dias de idade dos animais.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho também foram observados por Matijasic et al. (2006), que ao avaliarem a adição de *Lactobacillus gasseri* K7 e *Lactobacillus gasseri* LF221, para leitões dos 21 aos 42 dias de idade, observaram que esta adição não afetou a contagem de coliformes e clostrídios. No entanto, aos 30 dias de idade a contagem de coliformes diminuiu ($P<0,05$) em todos os grupos de leitões, além disso, observaram que a contagem de lactobacilos nos grupos alimentados com bactérias probióticas foi maior ($P<0,05$) aos 30 dias de idade.

O mesmo comportamento observado neste trabalho (Tabela 05) foi demonstrado por Walsh et al. (2008) avaliando a administração oral de probióticos composto por *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus salivarius* e *Pediococcus pentosaceus*, para suínos dos 26 aos 54 dias de idade, Possamai (2010) com inclusão de probiótico e inulina em rações para leitões dos 35 aos 49 dias de idade, Rao (2007) ao utilizar probiótico composto por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus salivarius*, em leitões dos 21 aos 35 dias de idade, não encontraram diferença entre os tratamentos para a contagem de bactérias acidoláticas e coliformes.

Da mesma maneira, Gebert et al. (2011), ao avaliarem o uso de um suplemento de leite, e um suplemento de leite combinado com *Lactobacillus brevis*, observaram que os tratamentos não tiveram nenhum efeito sobre a contagem de coliformes no duodeno, jejuno e íleo dos suínos durante o período experimental.

Por outro lado, os resultados obtidos para contagens de bactérias acidoláticas (Tabela 05) discordam dos obtidos por Stropfová et al. (2006) ao utilizarem *Enterococcus faecium* administrado via oral a leitões durante os primeiros sete dias de idade, encontraram menor concentração de *Escherichia coli* e maior concentração de *Enterococcus faecium* aos sete dias de aleitamento. Comportamento semelhante ao encontrado por Shim (2005) ao avaliar o uso via oral de probiótico *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus subtilis* e *Sacharomyces cerevisiae*, durante a fase de pré-desmame, notou aumento da população de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e diminuição de *Escherichia coli* aos 21 dias de idade.

Neste sentido, Takahashi et al. (2007) administrando oralmente *Lactobacillus plantarum*, em leitões aos 21 dias de idade, observaram que o número de lactobacilos foi significativamente maior aos 28 dias no grupo probiótico do que no grupo controle, no entanto, aos 35 dias de idade não houve diferença entre o grupo probiótico e o grupo controle, tanto nas fezes como no conteúdo do ceco. Os autores relataram que um aumento no número de lactobacilos durante o período pós-desmame é fundamental para o desenvolvimento de uma microbiota benéfica, pois os leitões são mais vulneráveis a patogenicidade neste período.

Da mesma forma, De Angelis et al. (2007), observaram que a administração de uma mistura de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus reuteri*, para leitões pós desmame durante 15 dias de tratamento, aumentou o número de lactobacilos nas fezes de maneira significativa em relação ao controle.

Os resultados obtidos para a contagem de coliformes discordam dos apresentados por Ross et al. (2010) que utilizaram probiótico oral em suínos aos 35 dias de idade, e observaram que houve diminuição significativa aos 50 dias de idade, sobre o número de enterobactérias

em animais do grupo alimentado com probióticos em comparação ao controle, segundo os autores a administração de estirpes probióticas para animais poderia atuar regulando a presença de bactérias Gram- negativas.

Comportamento semelhante foi demonstrado por Guerra et al. (2007), ao utilizarem probiótico em leitões dos 21 aos 63 dias de idade, observaram que a população de coliformes no grupo controle ao longo do tempo não foi significativa, enquanto nos grupos alimentados com probióticos *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus* e antibiótico, a contagem de coliformes diminuiu aos 63 dias ($P < 0,05$).

A administração de bactérias benéficas como *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* impede a colonização de patógenos, com manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. Segundo Utiyama (2004), esse mecanismo é denominado exclusão competitiva e se aplica às bactérias lácticas, pois além de competirem por nutrientes e por locais de ligação no epitélio intestinal, produzem substâncias capazes de reduzir as bactérias patogênicas, o que pode ter ocorrido no presente trabalho, pois a administração de probióticos embora não tenha apresentado diferenças significativas ($P > 0,05$) nas contagens de bactérias acidoláticas e coliformes (Tabela 05), observou-se maior contagem de lactobacilos e menor de coliformes nos leitões aos 35 dias de idade.

3.4 Conclusões

O tratamento probiótico de células inativadas aumentou o ganho de peso e ganho diário de peso dos leitões dos 21 aos 35 dias de idade quando comparado ao tratamento controle.

O uso oral de probiótico com células viáveis e inativadas não alterou as contagens microbiológicas das fezes de leitões do nascimento aos 35 dias de idade.

3.5 Referências

ABIPCES-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios>. Acessado em 07 abril. 2011.

- BENNO, Y. Research and development of probiotics for animal production. *Soil Micro*, v. 55, n.2, p. 105-111, 2001.
- BROOM, L.J., MILLER, H.M., KERR, K.G., et al. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Research in Veterinary Science*, v. 80, p. 45-54, 2006.
- CARDOZO, E.C. **Utilização de probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.69, p.10525-10575, 1999.
- CORREA, V.S.; JUNIOR, J.G.C.; VIEITES, F.M.; et al. Probiótico líquido para leitões lactentes em diferentes idades. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 11, n. 3, 2010.
- DE ANGELIS, M.; SIRAGUSA, S.; CAPUTO, L.; et al. Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. *Veterinary Microbiology*, v 123, n 1-3, p. 133-144, 2007.
- FREITAS, C.M. **Efeito da administração de bactérias ácido-láticas sobre o ganho de peso de leitões na maternidade**. 2008. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga.
- GARDINER GE.; CASEY PG.; CASEY G.; et al. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.1895–1906, 2004.
- GEBERT, S.; DAVIS, E.; REHBERGER, T.; et al. *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. *Beneficial Microbes*, v.2, p. 35-45, 2011.
- GIANG ,H.H.; VIET, T.Q.; OGLE, B.; et al. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. *Livestock Science*, v.129, p.95-103, 2010.
- GÓMEZ, M. S. C. **Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies**. 2006. Tese (Doutorado) Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2006.
- GUERRA, N.P.; BERNÁRDEZ , P.F.; MÉNDEZ,J.;et al. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, v. 134, ed. 1-2. P. 89-10, 2007.

- KOS, B.; SUSKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 981-987, 2003.
- KRAUSE, D.O.; EASTER, B.A.; WHITE, B.A.; et al. Effect of weaning diet on the ecology of adherent lactobacilli in the gastrointestinal tract of the pig. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2347, 1995.
- LESSARD, M.; DUPUIS, N.; GAGNON.; et al. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 922-934, 2009.
- LOJANICA, M.; MANOJLOVIĆ, M.; JEREMIĆ, D.; et al. The effects of probiotic *enterococcus faecium* dSM 7134 in the weaned pigs nutrition. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 26, p 57-64, 2010.
- MANGONI, J. **Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína**. 2009. 46f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon.
- MATIJASIC, B.B.; STOJKOVIC, S.; ROGELJ, I. Survival and in vivo adhesion of human isolates *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 in weaned piglets and their effects on coliforms, clostridia and lactobacilli viable counts in faeces and mucosa. **Journal of Dairy Research**, v.73, p. 417-422, 2006.
- MORAES, K.M C.M.T. **Probióticos para leitões lactantes e na fase de creche**. 2009. 34f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu.
- PIEPER, R.; JANCZYK, P.; URUBSCHUROV, V. et al. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. **International Journal of Food Microbiology**, p. 227-232, 2009.
- POSSAMAI, M. **Desempenho, metabolismo e microbiota intestinal de leitões alimentados com ração contendo probióticos e simbióticos**. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon.
- RAO, S.O. **Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus*-based probiotics on growth and gut environment of nursery pigs**. 2007. Dissertação (mestrado). Texas Tech University.
- RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, D. A.O.; TAKETOMI, E.A.; et al. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morphology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.6, 2007.
- ROSS, G.R.; GUSILS, C.; OLISZEWSKI, R.; et al. Effects of probiotic in swine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, n.6, p.545-549, 2010.

- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.** 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SAKATA, T.; KOJIMA, T.; FUGIEDA, M. et al. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig cecal bacteria *in vitro*. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 73-80, 2003.
- SANCHES, A.L.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T.; et al. Utilização de probiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. **Ciência agrotecnica**. Lavras, v. 30, n. 4, p. 774-777, 2006.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**., New York, v. 61, n. 3, p.91-99, 2003.
- SANTOS, M.S.; FERREIRA, C.L.L.F.; GOMES, P.C.; et al. Administração de *Lactobacillus sp* em Leitões nas Fases de Aleitamento e de Creche. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v. 26, n.1, p.165-173, 2002.
- SANTOS, M.S.; FERREIRA, C.L.L.F.; GOMES, P.C.; et al. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus sp.* sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciencia agrotecnica**, v.27, n.6, p.1395-1400, 2003.
- SANTOS, J. R. G.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.741-747, 2005.
- SILVA Jr, A. Interações químico-fisiológicas entre acidificantes, probióticos, enzimas e lisofosfolipídios na digestão de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.238-245, 2009.
- SILVA, M. L. F.; LIMA, J.A.F.; CANTARELLI, V.S.; et al. Probiotics and antibiotics as additives for sows and piglets during nursery phase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.11, p.2453-2459, 2010.
- SHIM, S.B. **Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of young pigs.** 2005. Tese (Animal Nutrition Group) - Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University and Centre, Wageningen.
- STATISCAL ANALYSES SYSTEM – SAS. SAS/STAT User's guide. Version 8.2.4.ed.v, 2.Cary: 2000.
- STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; et al. *Enterococcus faecium* EK13-anenterosin strain with A- producing probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**, v.12, p.242-248, 2006.
- TAKAHASHI, S.; EGAWA, Y.; SIMOJO, N.; et al. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.53, n.6, p.325-332, 2007.

- UTIYAMA, C.E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões desmamados.** Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2004.
- WALSH, M.C.; GARDINER, G.E.; HART, O.M.; et al. Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. **FEMS Microbiology Ecology**. v.64, n.2, p.317-327, 2008.
- WANG, YAN-BO; HAN JIAN-ZHONG. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. **Aquaculture**, v. 269, p. 349-354. 2007.

4 ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO COM CÉLULAS VIÁVEIS E INATIVADAS SOBRE OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS EM LEITÕES NA FASE DE ALEITAMENTO E CRECHE

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo avaliar o uso oral de probióticos com células viáveis e inativadas (“pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum* de origem suína), em relação aos parâmetros sanguíneos de leitões do nascimento aos 35 dias de idade. Foram utilizados, na fase de aleitamento, 108 leitões, e para a fase de creche 72 leitões com 21 dias de idade, distribuídos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram: tratamento A: 1 ml de caldo MRS (de Mann; Rogosa; Sharpe, 1960) + 1 ml de solução salina estéril (soro fisiológico); tratamento B: 1 ml de probiótico ($8,60 \times 10^7$ UFC/ml de um “pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum*) ativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina; tratamento C: 1 ml de probiótico contendo células inativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina. Observou-se diferença ($P < 0,05$) para globulina no tratamento controle em relação ao tratamento probiótico com células viáveis e células inativadas. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para as variáveis proteínas séricas totais, albumina, glicose, hemoglobina, leucócitos, hematócrito, hemácias, eosinófilos, bastões, segmentados, linfócitos, monócitos, plaquetas e para os níveis séricos de IgA entre os tratamentos. O uso oral de probiótico com células viáveis e inativadas não influenciou os valores das proteínas séricas totais, albumina, glicose, hemograma e os níveis de imunoglobulina A (IgA) enquanto o tratamento probiótico com células viáveis e inativadas diminuiu os níveis séricos de globulina.

Palavras chave: globulina, hemograma, IgA, lactobacilos, micro-organismos, suínos

ORAL ADMINISTRATION OF PROBIOTICS WITH VIABLE CELLS IS INACTIVATED ABOUT BLOOD PARAMETERS IN PIGLETS IN PHASE THE LACTATING AND NURSERY

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the oral use of probiotics with viable cells and inactivated ("pool" of *Lactobacillus sp.* and *Lactobacillus plantarum* of porcine origin) in relation to blood parameters of pigs from birth to 35 days old. Were used lactating 108 piglets, and for the nursery phase 72 piglets with 21 days old, divided into an experimental design of randomized blocks with three treatments and six repetitions.. The treatments were: Treatment A: 1 ml of MRS broth (Mann; entreaties; Sharpe, 1960) + 1 ml of sterile saline solution (saline), treatment B: 1 ml of probiotic (8.60×10^7 CFU / ml of a "pool" of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sp*) activated in MRS broth + 1 ml of saline, treatment C: 1 ml of inactivated probiotic containing cells in MRS broth + 1 ml of saline. Difference was observed ($P < 0.05$) to the globulin in the control treatment in relation to probiotic treatment with viable cells and cells inactivated. There were no significant differences ($P > 0.05$) for the variables serum protein, albumin, glucose, hemoglobin, leukocytes, hematocrit, red blood cells, eosinophils, rods, segments, lymphocytes, monocytes, platelets and serum levels of IgA between treatments. The use of oral probiotic with viable and inactivated cells did not influence the values of total serum protein, albumin, glucose, blood count and levels of immunoglobulin A (IgA) while treatment probiotic with viable and inactivated cells diminished serum globulin.

Key words: globulin, blood cell count, IgA, lactobacilli, micro-organisms, pigs

4. 1 Introdução

O desenvolvimento da suinocultura vem sendo caracterizado pela intensificação dos processos de criação, pelo aumento nos volumes de produção e pela busca a produtos de qualidade e para competir de maneira participativa no mercado internacional. Entretanto, a produção suína precisa adaptar-se à tendência da não-utilização de antimicrobianos, pois acredita-se que os mesmos possam causar resistência bacteriana e resíduos nas carnes, deste modo, uma das alternativas utilizadas na produção animal é o uso de aditivos nas dietas para melhorar os índices zootécnicos e maximizar a produção (COSTA et al., 2007).

Dentre estes, podem ser citados os probióticos, os quais são definidos pelo Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2004) como cepas específicas de várias espécies de micro-organismos que agem como auxiliares na recomposição da microbiota intestinal dos animais, diminuindo a ocorrência de micro-organismos patogênicos ou indesejáveis.

O uso de bactérias probióticas pode ser uma alternativa aos antimicrobianos na melhoria da saúde animal e na proteção contra agentes infecciosos (SCHIFFRIN e BLUM, 2002). Dessa maneira, *Bifidobacterium longum* e outras bactérias lácticas têm sido estudadas para aumentar a quantidade total de IgA no intestino (TAKAHASHI et al., 1998; VITINI et al., 2000). Da mesma forma, tem-se relatado a atividade imunoadjuvante do *Lactobacillus casei* (Perdigon et al., 1991) e o aumento na produção de anticorpos contra a bactéria *Escherichia coli* por *Lactobacillus plantarum* (HERIAS et al., 1999). De acordo com Menten (2001), alguns gêneros de bactérias intestinais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune, produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon.

A IgA secretada na mucosa entérica é o principal anticorpo do intestino, com a capacidade de impedir a aderência de micro-organismos à superfície dos enterócitos. Esta IgA secretora se diferencia da IgA sérica por apresentar-se na configuração de dímeros formados pela parte secretora para conferir resistência contra a proteólise na luz intestinal (MORAIS e NETO, 2003).

O sangue é responsável pela oxigenação dos tecidos, transporte de nutrientes, hormônios, anticorpos, produtos de excreção e pela defesa do organismo animal, sendo composto por uma fase líquida onde dissolvem-se proteínas, açúcares, sais e íons, e uma parte sólida, formada por diferentes tipos celulares, representados pelas hemácias, leucócitos e plaquetas. A quantidade de hemácias, leucócitos e plaquetas no sangue dos animais pode ser

alterada por diversos fatores, entre estes, idade, condições fisiológica e sanitária, ocorrência de desordens clínicas, condições de estresse, temperatura ambiental e nutrição (FELDMAN et al., 2000).

Nos leitões, o estresse provocado por ocasião do desmame estimula respostas fisiológicas e metabólicas, que podem alterar o quadro eritroleucométrico, e o padrão seroprotéico (HANNAS, 2003, BUDIÑO et al., 2004). Em resposta a essas modificações, na maioria das vezes, ocorre redução no desempenho associado principalmente às alterações bioquímicas do sistema imunológico, que pode estar relacionada aos nutrientes da dieta, patógenos e agentes físico-ambientais (LI et al., 1990).

Dessa maneira, este trabalho teve por objetivo avaliar o uso oral de probióticos com células viáveis e inativadas (“pool” de *Lactobacillus sp.* e *Lactobacillus plantarum* de origem gastrointestinal de suínos), sobre os parâmetros sanguíneos de leitões do nascimento aos 35 dias de idade.

4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em uma Unidade de Produção de Leitões com 730 matrizes, sendo a granja considerada de alto desafio sanitário, localizada em Nova Santa Rosa, região Oeste do Estado do Paraná. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Parâmetros Sanguíneos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná *Campus* Marechal Cândido Rondon/PR e no Laboratório Álvaro – Centro de Análises e Pesquisas Clínicas – Cascavel-PR.

4.2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados, na fase de aleitamento, 108 leitões provenientes de 18 matrizes ao quarto parto, da linhagem Dalland. Foram utilizadas três salas de maternidade com celas de parição suspensas, dotadas de comedouro de concreto e bebedouro tipo chupeta para as matrizes, comedouros e bebedouros chupeta específicos e escamoteadores com lâmpada incandescente para os leitões. A ventilação e a temperatura dentro das salas de maternidade foram controladas através do fechamento e abertura de cortinas.

O peso médio inicial dos leitões foi de 1.410 gramas a partir do nascimento, sendo distribuídos em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. Cada unidade experimental foi representada por uma leitegada, utilizando-se os seis leitões mais próximos da média da mesma, estes foram identificados através de marcação na orelha direita. Durante o período experimental os leitões receberam as mesmas condições de manejo da granja.

Para a fase de creche foram utilizados 72 leitões com 21 dias de idade, com peso médio inicial de 5,47 Kg, distribuídos em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com três tratamentos e seis repetições. A unidade experimental foi representada pela baia onde foram alojados quatro animais, sendo dois machos castrados e duas fêmeas. O peso individual inicial foi adotado como critério para a escolha dos animais, o qual deveria estar o mais próximo da média da leitegada.

Os animais foram alojados em um galpão de alvenaria com piso de concreto e telhas de cerâmica, dotado de baias suspensas, comedouros semi-automáticos, bebedouros tipo chupeta e piso de madeira vazado. A ventilação e a temperatura dentro da sala da creche foram controladas de acordo com a observação do conforto térmico dos animais, através da abertura e fechamento das cortinas.

Os tratamentos foram os seguintes:

Tratamento A: 1 ml de caldo MRS (de Mann; Rogosa; Sharpe, 1960) + 1 ml de solução salina estéril (soro fisiológico);

Tratamento B: 1 ml de probiótico ($8,60 \times 10^7$ UFC/ml de um “pool” de *Lactobacillus sp* e *Lactobacillus plantarum*) ativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina;

Tratamento C: 1 ml de probiótico contendo células inativadas no caldo MRS + 1 ml de solução salina.

Os tratamentos foram administrados via oral aos leitões diariamente no período da manhã, do nascimento aos 35 dias de idade, sendo 1 ml por leitão na fase de aleitamento conforme descrito por Correa et al. (2010) e 2 ml na fase de creche de acordo com Pieper et al. (2009).

4.2.2 Origem das cepas

As cepas de lactobacilos empregadas neste experimento foram isoladas das fezes de leitões e analisadas “*in vitro*” por Mangoni (2009).

4.2.3 Liofilização das cepas probióticas

As cepas selecionadas com características probióticas (MANGONI, 2009), foram reativadas através de três repicagens sucessivas em caldo MRS estéril e incubadas a 37°C por 18 horas (SANTOS 2003). Posteriormente foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o concentrado de células ressuspensionado em água destilada estéril, procedendo-se posteriormente uma nova centrifugação, sendo o sobrenadante novamente descartado e o concentrado ressuspensionado em LDR 14% (leite desnatado reconstituído), congeladas à -20 °C e liofilizadas (Liofilizador L 101, Liobrás, São Carlos, Brasil).

Foram liofilizadas 14 cepas de lactobacilos sendo que após a liofilização as amostras foram diluídas em água destilada esterilizada, obtendo-se uma diluição inicial de 1:10 com sucessivas diluições até 10^{-7} onde realizou-se a semeadura em ágar MRS para verificação da viabilidade celular.

As cepas foram avaliadas quanto à viabilidade celular durante um período de 30 dias e as mais resistentes ao processo de liofilização foram então empregadas nesta experimentação (Tabela 01).

Tabela 01. Viabilidade celular (UFC/ ml) de cepas de lactobacilos de origem gastrointestinal de suínos antes e após o processo de liofilização

Cepas	Antes da liofilização	Após liofilização
1	$1,14 \times 10^9$	$5,10 \times 10^6$
2	$2,49 \times 10^9$	$2,48 \times 10^5$
3	$3,05 \times 10^9$	$5,10 \times 10^8$
4	$2,40 \times 10^9$	$6,58 \times 10^8$
5	$1,04 \times 10^9$	$3,20 \times 10^2$
6	$1,29 \times 10^9$	$3,10 \times 10^7$
7	$2,80 \times 10^9$	$6,70 \times 10^3$
8	$1,49 \times 10^9$	$5,30 \times 10^3$
9	$1,01 \times 10^9$	$3,30 \times 10^7$
10	$1,95 \times 10^9$	$2,00 \times 10^7$
11	$6,90 \times 10^8$	$4,60 \times 10^6$
12	$1,85 \times 10^9$	$2,26 \times 10^4$
13	$1,67 \times 10^9$	$4,10 \times 10^5$
14	$6,50 \times 10^8$	$1,34 \times 10^3$

UFC/ ml - Unidade formadora de colônia/ ml

4.2.4 Manutenção e preparo das culturas probióticas

Antes do preparo de cada quantidade, as cepas foram descongeladas e reativadas através de três repicagens sucessivas em caldo MRS estéril e incubadas a 37°C por 18 horas (SANTOS, 2003).

O probiótico foi preparado a partir das culturas ativas, identificadas como L3, L4, L9 e L14, sendo estas submetidas a diversos testes, de compatibilidade, de resistência ao ácido clorídrico, tolerância aos sais biliares e fenol, hidrofobicidade e inibindo *Escherichia coli*. A L3 e L14 foram identificadas pela Fundação André Tosello, Campinas-SP como *Lactobacillus plantarum*; as mesmas foram inoculadas em caldo MRS estéril e incubadas a 37°C por 18 horas. (SANTOS, 2003). O probiótico foi envasado em recipientes estéreis e resfriado a 5°C, sendo verificada a viabilidade celular através da semeadura em ágar MRS durante o período de sete dias.

O probiótico inativado foi preparado seguindo a mesma metodologia, porém a inativação foi realizada pelo calor úmido, autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Para confirmação da inativação realizou-se a semeadura em ágar MRS.

4.2.5 Composição das rações

Os leitões receberam ração pré-desmame dos 10 aos 21 dias e pré-inicial I dos 21 aos 35 dias de idade (Tabela 02), sendo que as rações e a água foram fornecidas a vontade. As rações foram formuladas visando atender as exigências nutricionais dos animais, propostas por Rostagno et al. (2005).

Tabela 02. Composição centesimal das rações utilizadas para leitões dos 10 aos 21 e dos 21 aos 35 dias de idade

Ingredientes %	10 aos 21 dias de idade	21 aos 35 dias de idade
Milho	54,565	54,538
Farelo de soja	10,605	14,564
Soro de leite em pó	10,107	10,000
Leite em pó	5,770	5,890
Plasma <i>spray dried</i>	5,000	4,000
Açúcar	4,000	3,000
Farinha de peixe 54%	4,000	3,000
Fosfato bicálcico	1,883	1,267
Óleo/soja	1,615	1,550
L-lisina HCL	0,713	0,477
Óxido de zinco	0,350	0,350
Sal comum	0,328	0,234
Cloreto de colina (60%)	0,200	0,200
DL-metionina	0,321	0,195
L-treonina	0,286	0,142
Mistura vitamínica ²	0,120	0,120
L-triptofano	0,076	0,045
Mistura mineral ³	0,040	0,050
Calcário calcítico	0,011	0,368
Antioxidante ¹	0,010	0,010
Total	100,000	100,000
Composição Calculada ⁴		
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3,325	3,324
Proteína bruta (%)	19,997	20,000
Lactose (%)	10,017	10,004
Cálcio (%)	0,888	0,825
Sódio (%)	0,280	0,230
Potássio (%)	0,596	0,657
Cloro (%)	0,684	0,612
Fósforo disponível (%)	0,560	0,449
Lisina digestível (%)	1,520	1,330
Metionina digestível (%)	0,623	0,502
Met+Cis. Digestível (%)	0,851	0,745
Treonina digestível (%)	0,958	0,837
Triptofano digestível (%)	0,275	0,253

¹BHT: Butil Hidroxitolueno; ²Conteúdo/kg: ferro 100g; cobalto 1g; manganês 40g; zinco 100g; iodo 1,5g; e veículo q.s.p 1000g. ³Conteúdo/kg: vit.A, 10.000.00 U.I.; vit.D₃, 1.5000.000 U.I.; vit.E, 30.000 U.I.; vit.B₂, 5,0 g; vit B₆, 3,0 g; vit.B₁₂ 30.000 mcg; ácido nicotínico 30.000 mcg; ácido pantotênico 12.000 mcg; vit.K₃ 2.000 mg; ácido fólico 800 mg; biotina 100 g e veículo q.s.p 1.000g. ⁴Valores obtidos de Rostagno et al.(2005).

4.2.6 Parâmetros Sanguíneos

Para o monitoramento do padrão sanguíneo e avaliação do sistema imune, foram coletadas amostras de sangue aos 7, 21 e 35 dias de idade, provenientes de um leitão com peso mais próximo da média de cada unidade experimental. O sangue foi coletado de acordo com a metodologia proposta por Corassa (2004), sendo as amostras colhidas por punção da veia jugular. O sangue foi acondicionado em dois tubos: 1) contendo anticoagulante EDTA para a determinação do hemograma (eritograma e leucograma); 2) sem anticoagulante para a determinação de Imunoglobulina A (IgA), proteínas totais, albumina, globulina e glicose.

4.2.6.1 Análises de Hemograma

Imediatamente após a coleta do sangue, os tubos foram levemente agitados homogeneizando o sangue com o anticoagulante, e em seguida colocado em recipiente termicamente isolado contendo gelo. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório Álvaro – Centro de Análises e Pesquisas Clínicas – Cascavel-PR, onde determinou-se o leucograma, leucócitos (μL), linfócitos (%), eosinófilos (%), bastões (%), segmentados (%), monócitos (%) e o eritograma, hemácias ($10^3/\mu$), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), e contagem de plaquetas (μL), pelo método da resistividade-impedância-colorimétrica (medidas eletrônicas e físicas).

4.2.6.2 Análises de Imunoglobulina A (IgA)

A determinação de IgA foi realizada pelo Laboratório Álvaro – Centro de Análises e Pesquisas Clínicas – Cascavel-PR, através do método da Nefelometria.

4.2.6.3 Análises de proteínas totais, albumina sérica, globulina e glicose

As análises de proteínas totais, albumina sérica e globulina foram realizadas no Laboratório de Parâmetros Sanguíneos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná *Campus* Marechal Cândido Rondon/PR.

As amostras de sangue destinadas às análises de proteínas séricas totais e albumina foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, empregando-se kits específicos para a determinação. Para a análise de proteínas séricas totais (g/dL), utilizou-se método de biureto e para a determinação de albumina (g/dL) utilizou-se o verde de bromocresol, com leitura das absorvâncias por meio de espectrofotômetro. As amostras foram analisadas em duplicata.

Conforme descrito por Budiño et al. (2004), determinou-se a concentração de globulina (g/dL) pelo resultante da subtração de albumina da proteína total.

A determinação da glicose (mg/dL) plasmática dos leitões foi realizada imediatamente após a coleta do sangue, através do kit de monitoramento de glicemia Accu-Chek Active, marca Roche.

4.2.7 Modelo experimental utilizado

O modelo experimental usado nas análises dos parâmetros sanguíneos foi de parcelas subdivididas, com três tratamentos nas parcelas. As medições ao longo do tempo (7, 21 e 35 dias de idade) constituíram as subparcelas, tendo as análises estatísticas dos dados realizadas conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ij} + T'_k + TT'_{ik} + e_{ijk}$$

sendo que:

Y_{ijk} : observação referente ao i-ésimo tratamento, na j-ésima repetição, no k-ésimo tempo;

μ : média geral do experimento;

T_i : efeito do i-ésimo tratamento T;

e_{ij} : erro experimental associado ao i-ésimo tratamento T na j-ésima repetição;

T'_k : efeito do k-ésimo tempo T';

TT'_{ik} :efeito da interação entre o i-ésimo tratamento T com o k-ésimo tempo T';

e_{ijk} : erro experimental associado a ijk-ésima observação

Os dados foram submetidos às análises estatísticas, utilizando o Statistical Analyses System (SAS 2000) e como procedimento estatístico foi utilizado o teste de Tukey.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Parâmetros sanguíneos dos leitões dos tratamentos controle e probiótico com células viáveis e inativadas

Os resultados das análises dos parâmetros sanguíneos dos leitões em relação aos tratamentos controle, probiótico com células viáveis e inativadas, e dos diferentes dias de coleta 7, 21 e 35 dias de idade, encontram-se na tabela 03.

Tabela 03. Valores de proteínas séricas totais, albumina, globulina e glicose no sangue de leitões dos diferentes tratamentos e dias de coleta

Tratamentos	Proteínas Séricas Totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)	Glicose (mg/dL)
Controle	5,15	3,41	1,74 a	110,94
Ativo	4,79	3,40	1,39 b	113,72
Inativo	4,75	3,34	1,41 b	116,05
Tempo (dias)				
7	5,96 a	2,62 c	3,33 a	121,77 a
21	4,55 b	3,66 b	0,88 b	123,38 a
35	4,18 b	3,86 a	0,31 c	95,55 b
CV(%) ¹	9,22	6,52	30,19	10,93

*Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos e os tempos diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. ¹CV- coeficiente de variação

Os valores de proteínas séricas totais e albumina são similares aos descritos por Huaynate (2008) de 5,23 e 3,05 respectivamente.

A globulina, de acordo com Gonzalez e Silva (2003), é uma das principais proteínas do sangue desempenhando diversas funções como a manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue; transportes de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, além da regulação do pH sanguíneo e da participação na coagulação do sangue. Neste trabalho observou-se maior valor de globulina ($P < 0,05$) para o tratamento controle em relação ao tratamento probiótico com células viáveis e inativadas. Segundo Nunes et al. (2010) variações nos valores de globulina podem ocorrer devido a fatores fisiológicos, estresse e infecções bacterianas. Neste sentido Robles (2007) cita que o uso de probióticos diminuiu a capacidade de síntese de globulina, dessa maneira pode diminuir as infecções dos leitões no período após o desmame.

Para as variáveis proteínas séricas totais, albumina e glicose não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Resultados similares para proteínas séricas totais, albumina e glicose (Tabela 03) foram demonstrados Chiquieri et al. (2007) que ao avaliarem dietas sem aditivos, com antibiótico (Nitrovim), probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*), prebiótico (mananoligossacarídeo) e probiótico + prebiótico para leitões desmamados, não observaram efeitos significativos ($P>0,05$). Comportamento semelhante também foi observado por Budiño et al. (2004) ao analisarem o uso de antibiótico (bacitracina de zinco), probiótico constituído de (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*), prebiótico (frutoligossacarídeo) e simbiótico na ração de leitões desmamados, não observaram diferença significativa entre os tratamentos.

Da mesma forma, Huaynate (2008) avaliando dietas com e sem adição de probiótico para leitões dos 21 aos 49 dias de idade, também não observou diferenças para proteínas séricas totais, albumina e alfa globulina entre os tratamentos.

No entanto, Strompfová et al. (2006) utilizando *Enterococcus faecium* e Link et al. (2005) utilizando *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* via oral em leitões observaram que as concentrações de proteínas totais foram significativamente maiores para o tratamento probiótico em relação ao controle.

Para os diferentes dias de coleta, 7, 21 e 35 dias de idade dos leitões foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) para todas as variáveis analisadas (Tabela 03).

Independente dos tratamentos, a proteína sérica total foi maior aos 7 dias ($P<0,05$) em relação aos 21 e 35 dias de idade, não diferindo dos 21 aos 35 dias de idade ($P>0,05$). De acordo com Kaneko (1989) a albumina é sintetizada pelo fígado, sendo catabolizada por todos os tecidos metabolicamente funcionais e quando a concentração dos aminoácidos diminui nas células teciduais a níveis inferiores aos encontrados no plasma, os aminoácidos, adentram nas células e são utilizados para síntese de proteínas essenciais dos tecidos (SWENSON, 1984). A redução nos níveis de proteínas séricas totais (Tabela 03), provavelmente se deve ao baixo consumo de ração pelo leitão no período pós-desmame, acarretando assim em diminuição de suas reservas protéicas. (BUDIÑO et al., 2004).

Para a albumina verificou-se que o menor valor ($P<0,05$) foi encontrado aos 7 dias de idade com posterior aumento ($P<0,05$) aos 21 e 35 dias de idade. Segundo González e Scheffer (2002), o aumento da albumina plasmática pode ocorrer pela desidratação ou pela perda excessiva de fluídos, fato este observado neste trabalho pela desidratação visível de alguns leitões.

A concentração de globulina foi maior ($P<0,05$) aos 7 dias diminuindo aos 21 e 35 dias de idade. As globulinas podem estar diminuídas nas imunodeficiências associadas à

deficiências nos linfócitos B (TIZARD, 2009). O que pode ser compreendido pelo fato de que nesta fase pós-desmame os animais passam por inúmeras mudanças entre elas, alterações na alimentação, troca de ambiente, mistura de leitegadas, entre outros fatores que podem afetar a imunidade dos animais.

Huaynate (2008) encontrou para a albumina um valor maior ($P < 0,05$) aos 21 dias de idade em relação aos demais dias de coleta. Não observou diferença para a proteína sérica total em nenhum dos períodos avaliados (21, 28, 35, 42 e 49 dias de idade), tais resultados apresentam-se contrários aos deste trabalho (Tabela 03).

Para o período de lactação, não foram observadas diferenças nos níveis de glicose (Tabela 02), comportamento semelhante foi observado por Strompfová et al. (2006), que ao utilizarem *Enterococcus faecium* administrado via oral aos leitões do nascimento aos 14 dias de idade, não observaram diferença significativa para os valores de glicose. Neste trabalho observou-se decréscimo nos níveis de glicose ($P < 0,05$) aos 35 dias de idade em relação aos 7 e 21 dias de idade (Tabela 03), no entanto, apresentam-se normais quando comparados com os valores de referência (KANEKO, 1997).

4.3.2 Valores do hemograma dos leitões dos tratamentos controle e probiótico com células viáveis e inativadas

Os resultados do hemograma em relação aos tratamentos controle, probiótico com células viáveis e inativas e nos diferentes dias de coleta estão apresentados na tabela 04. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para as variáveis analisadas entre os tratamentos. Esses resultados corroboram com os estudos de Budiño et al. (2004) que ao avaliarem dietas contendo antibiótico, probiótico, prebiótico e simbiótico para leitões dos 21 aos 35 dias de idade não observaram diferenças significativas para as mesmas variáveis estudadas no presente trabalho.

Corroborando com os resultados encontrados (Tabela 04), Chiquieri et al. (2007) ao avaliarem dietas sem aditivos, com antibiótico (Nitrovim), probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*), prebiótico (mananoligossacarídeo) e probiótico + prebiótico para leitões desmamados, também não observaram efeitos significativos ($P > 0,05$) para a leucometria global, linfócitos, monócitos e eosinófilos.

Segundo Feldman et al. (2000) a função primordial dos eosinófilos é combater substâncias tóxicas e, portanto, estarão presentes em maior quantidade nos locais onde

ocorrem reações antígeno anticorpo e nos pontos de penetração de substâncias estranhas ao organismo e, em menor quantidade, na corrente circulatória em situações de estresse, reaparecendo posteriormente a estas situações, o que pode elucidar o menor valor observado nos leitões aos 21 dias de idade (Tabela 04) possivelmente devido ao estresse por ocasião do desmame.

Rao (2007) ao utilizar probiótico composto por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus salivarius*, em leitões dos 21 aos 35 dias de idade, também não observaram diferença ($P>0,05$) nos linfócitos, neutrófilos, monócitos, leucócitos, glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina entre os tratamentos.

Os resultados observados neste trabalho (Tabela 04) contrastam com o estudo de Huaynate (2008) que ao avaliar dietas com adição ou não de probiótico para leitões dos 21 aos 49 dias de idade, observaram que as concentrações de hemoglobina, hematócrito, plaquetas e linfócitos foram maiores nos animais do tratamento com probiótico e os valores de leucócitos foram maiores para os leitões do tratamento controle em relação ao tratamento probiótico.

Em relação aos diferentes dias de coleta (Tabela 04), observou-se aumento ($P<0,05$) no valor dos leucócitos aos 35 dias de idade. De acordo com Feldman et al. (2000) a adrenalina liberada em resposta à agitação ou estresse, movimenta as células leucocitárias marginais para a circulação, acarretando em aumento na contagem total dos leucócitos quando o animal está estressado, o que pode esclarecer o aumento dessas células após o desmame devido ao estresse naturalmente presente neste período.

A percentagem de bastões e segmentados foi menor ($P<0,05$) no dia 7 comparado ao dia 21 (Tabela 04). Um aumento ($P<0,05$) no número de hemoglobina e hematócrito foi observado no dia 7 em relação aos dias 21 e 35 dias de idade dos animais, mantendo-se constante dos 21 aos 35 dias de idade. Essa diferença nos níveis de hemoglobina e hematócrito pode ser devido à deficiência de ferro dos leitões, sendo que nas primeiras semanas de vida é comum o leitão ter anemia (KEGLEY et al., 2002), e entre as causas dessa anemia, destacam-se, o baixo estoque de ferro do leitão ao nascimento, os reduzidos níveis de ferro no leite da porca e a elevada taxa de crescimento do animal (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

Tabela 04. Hemograma dos leitões de acordo com os tratamentos e diferentes dias de coleta de sangue

	Hb (g/dL)	Le (μ L)	Ht (%)	He ($10^3/\mu$)	Eos (%)	Bast (%)	Seg (%)	Linf (%)	Mon (%)	Plaq (μ L)
Tratamentos										
Controle	10,74	16,48	40,14	5,55	0,77	1,61	47,44	42,94	3,44	491,67
Ativo	10,45	16,03	40,98	5,37	0,66	1,33	42,94	31,22	2,55	505,94
Inativo	9,95	17,02	39,42	5,02	1,00	3,05	50,88	42,33	3,11	487,50
Tempo (dias)										
7	8,72b	12,81b	31,86b	6,222a	0,61a	3,22a	55,50a	36,77a	3,66a	509,06a
21	11,27a	11,52b	46,17a	5,716b	0,55a	0,55b	37,44b	36,00a	3,22a	487,78a
35	11,14a	25,20a	42,51a	4,022c	1,27a	2,22ab	48,33ab	43,72a	2,22a	488,28a
CV ¹	6,47	25,09	14,25	6,95	29,35	35,81	36,40	42,43	25,68	35,28

Hb- hemoglobina, Le- leucócito, Ht- hematócrito, He- hemácias, Eos- eosinófilos, Bast- bastões, Linf- linfócitos, Mon- monócitos, Plaq- plaquetas. *Médias seguidas de letras diferentes entre os tempos diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. ¹CV- coeficiente de variação

Os valores de hemácias diminuíram ($P < 0,05$) ao longo dos dias (Tabela 04). O declínio nos valores das hemácias na primeira semana de vida está relacionado à rápida expansão do volume plasmático induzida pelo consumo do colostro, destruição de eritrócitos fetais e fornecimento insuficiente de ferro para a síntese de hemoglobina (JAIN, 1993).

Segundo Macari e Luquetti (2002) nas situações de estresse a que os leitões são submetidos, sobretudo na fase de creche, ocorre liberação do hormônio corticotrófico (ACTH) que determina a redução da quantidade de linfócitos circulantes. Corroborando Huaynate (2008) cita que os linfócitos têm papel fisiológico de extrema importância na imunidade do animal, por produzirem anticorpos, principalmente imunoglobulina G, no entanto, no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos diferentes dias de coleta para eosinófilos, linfócitos e monócitos (Tabela 04).

Neste sentido, Carlos et al. (2003) reportaram que a ingestão de bactérias lácticas pode aumentar a resistência a infecções por micro-organismos patogênicos devido ao aumento aparente na ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa no baço e em placas de Peyer.

Huaynate (2008) observou que os valores de eosinófilos e plaquetas diminuíram aos 28, 35, 42 e 49 dias em comparação aos 21 dias de idade; já os valores de linfócitos foram mantidos constantes aos 21 e 28 dias de idade, porém, reduziram aos 35 dias de idade atingindo valores máximos aos 49 dias de idade. Observou também que os valores de hemácias, leucócitos, hemoglobina e hematócrito aumentaram aos 28 dias de idade, resultados estes contrários ao encontrados no presente trabalho, com exceção dos resultados para leucócitos que também aumentaram ($P < 0,05$) aos 35 dias de idade (Tabela 04).

Strompfová et al. (2006) ao utilizarem *Enterococcus faecium* administrado via oral aos leitões durante os primeiros sete dias de idade, observaram que os valores de hemoglobina e leucócitos foram maiores aos 14 dias de idade em leitões do tratamento probiótico, os valores de hematócrito foram maiores aos 7 e 14 dias de idade no tratamento com probiótico.

Corroborando com o presente trabalho, Link et al. (2005) ao avaliarem probiótico oral composto por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* em leitões do nascimento aos 35 dias de idade, não observaram diferenças significativas para leucócitos entre os tratamentos. No entanto os autores relataram diferenças ($P < 0,05$) para a hemoglobina, sendo maior aos 28 dias de idade para o tratamento probiótico, e observaram também que o número de hematócrito no grupo probiótico aumentou gradualmente até o final do experimento sendo observadas diferenças entre os tratamentos aos 28 e 35 dias de idade.

As diferenças observadas em algumas variáveis (Tabela 04) nos diferentes dias de coleta ocorrem de acordo com Hannas (2003) possivelmente devido ao estresse provocado pelo desmame, pela ausência materna, hierarquia social, mudança da dieta, instalações e redução no consumo de alimento.

4.3.3 Valores séricos de imunoglobulina A (IgA) dos leitões

De acordo com Rodrigues (2002) quando são adicionados probióticos à dieta, espera-se que os mesmos funcionem como antígenos, os quais devem estimular a produção de IgA. No entanto, no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para os níveis séricos de IgA nos tratamentos controle, probiótico com células viáveis e inativadas (Tabela 05).

Tabela 05. Níveis séricos de IgA nos leitões em função dos tratamentos e dos diferentes dias de coleta

Tratamentos	IgA (mg/dL)
Controle	27,79
Ativo	26,08
Inativo	28,49
Tempo (dias)	
7	37,94a
21	41,62b
35	2,79c
CV ¹	15,94

*Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos e os tempos diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. ¹CV- coeficiente de variação

Em relação aos diferentes dias de coleta (Tabela 05), observou-se que os níveis de IgA aumentaram dos 7 aos 21 dias. Esse aumento nos níveis de IgA dos 7 aos 21 dias de idade pode estar relacionado ao fato da IgA ser a imunoglobulina mais resistente a degradação intestinal, tornando-se atuante a partir do 3º dia de lactação e persistindo até o fim desta (PINHEIRO, 2005). A diminuição nos níveis séricos de IgA dos 21 aos 35 dias de idade está de acordo com o citado por Almeida (2007) que verificou que o desmame gera diminuição na produção de imunoglobulinas, possivelmente em virtude do estresse associado a esse período.

Rodrigues et al. (2007), ao avaliarem o uso de probiótico contendo células inativadas composto por *Lactobacillus acidophilus* e probiótico com células viáveis composto por

Lactobacillus acidophilus, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum*, em leitões do nascimento aos 30 dias de idade, observaram que o nível sérico de IgA foi maior no grupo probiótico com células viáveis ($P < 0,05$) do que no tratamento controle e probiótico com células inativadas, sendo que entre esses últimos não houve diferença.

Segundo Tizard (1992), os probióticos viáveis são transferidos a partir de células duodenais M para os linfócitos intra-epiteliais, agindo assim como antígenos que estimulam os plasmócitos para secretar IgA. Esta produção de IgA gera uma reação nos linfonodos mesentéricos aumentando o número de células que expressam IgA. Embora não tenha sido observado efeito significativo, os níveis de IgA foram mais elevados no tratamento probiótico com células inativadas (Tabela 05). Dessa maneira, as células inativadas podem ter agido como antígenos estimulando a síntese de IgA nos tecidos linfáticos do intestino. Este efeito é benéfico, porque o aumento de IgA no intestino evita a infecção local e absorção de alérgenos (HE et al., 2005).

A expansão dos precursores das células plasmáticas de IgA nas placas de Peyer é causada pela estimulação antigênica que chega ao intestino, essas células podem vir do plasma normal, da microbiota intestinal patológica, ou a partir de alimentos (CAHILL et al., 1976, AHLSTEDT et al., 1977, HUSBAND e GOWANS, 1978). Portanto, a ingestão do antígeno é extremamente importante para manter a resposta do sistema imune da mucosa. A ingestão do antígeno pode induzir a síntese de IgA em locais diferentes ou a tolerância sistêmica (CHALLACOMBE e TOMASI, 1980; KAGNOFF, 1982). O lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias Gram-negativas da microbiota normal desempenha um papel importante nos mecanismos de tolerância, porque eles podem estar envolvidos na maturação dos precursores de células T que atuam como supressores no trato gastrointestinal (KIYONO et al., 1982).

Kamimura et al. (2006) ao avaliarem o uso de prebiótico, antimicrobiano (sulfato de colistina) ou associação de ambos na ração de leitões dos 21 aos 63 dias de idade, não observaram diferenças ($P > 0,05$) nos níveis séricos de IgA aos 21 e 35 dias de idade entre os tratamentos, no entanto, aos 63 dias de idade os níveis séricos de IgA dos leitões do tratamento antimicrobiano + prebiótico foram superiores ($P < 0,05$) ao tratamento com antimicrobiano. Os autores relataram que este aumento possa estar relacionado ao fato que a associação com o prebiótico estimule a população de bactérias produtoras de ácido lático, que intensificam a atividade de macrófagos e linfócitos (SISSONS, 1989). Este efeito sobre a estimulação da população de bactérias produtoras de ácido lático pode ter ocorrido no

presente trabalho (Tabela 05), embora não significativo o tratamento inativado apresentou um aumento de IgA em relação aos demais tratamentos.

Os resultados de IgA (Tabela 05) são condizentes com os de Scharek et al. (2005) que ao avaliarem a influência de probiótico composto por *Enterococcus faecium* em matrizes administrado desde a gestação e na ração dos leitões até os 56 dias de idade dos leitões, não observaram diferenças significativas nos níveis de IgA fecal entre o tratamento com probiótico e controle. Da mesma maneira, Broom et al. (2006) avaliando dois níveis de suplementação de óxido de zinco e dois níveis de *Enterococcus faecium* na ração de leitões desmamados, não observaram diferença nos níveis de IgA intestinal nos leitões aos 28 dias de idade entre os tratamentos.

A diminuição nos níveis de IgA após o desmame (Tabela 05) foram também demonstrados por Lessard et al. (2009) que ao avaliarem a administração dos probióticos *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, ou ambos durante a lactação por via oral, três vezes por semana para os leitões, e adicionados a ração ao desmame, observaram que houve uma redução nos níveis de IgA no íleo em todos os grupos após o desmame.

Link et al. (2005) avaliando probiótico oral composto por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* em leitões do nascimento aos 35 dias de idade, observaram que os níveis de imunoglobulinas séricas totais nos leitões do tratamento controle foram menores em relação ao tratamento probiótico aos 7 dias de idade. Os autores relataram que a concentração de imunoglobulinas séricas totais no sangue dos leitões é influenciada principalmente pela absorção de colostro e, conseqüentemente, pelas imunoglobulinas do colostro, dessa maneira o consumo dos leitões nessa fase têm um papel importante, e que pode ser melhorado pela ingestão de bactérias probióticas.

De acordo com Bailey et al. (2001) o estado imunológico é determinado por um complexo conjunto de interações, envolvendo não só o sistema imunológico, mas também as funções e atividades celulares e os desafios microbiológicas com que são confrontados, dessa maneira mais estudos são necessários para elucidar as interações dos probióticos no equilíbrio do sistema imune, sendo este diretamente relacionado ao desempenho animal.

4.4 Conclusões

O uso oral de probiótico com células viáveis e inativadas não influenciou os valores das proteínas séricas totais, albumina, glicose, hemograma e os níveis de imunoglobulina A (IgA).

A administração de probiótico com células viáveis e inativadas diminuiu os níveis séricos de globulina.

4.5 Referências

- ALMEIDA, R.F.; LOPES, E.L.; NUNES, R.C. Ferro e imunidade humoral em suínos alimentados com fitase e níveis reduzidos de fósforo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, p. 767-776, 2007.
- ALHSTEDT, S.; CARLSSON, B.; FALLSTROM, S.P.; et al. Antibodies in human serum and milk induced by enterobacteria and food proteins. **In Immunology of the Gut**, Ciba Foundation Symposium, v.46,p 115, 1977.
- BAILEY, M., PLUNKETT, F.J., ROTHKOTTER, H.J., et al. Regulation of mucosal immune responses in effector sites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.60, p.427–435, 2001.
- BUDIÑO, F.E.L; THOMAZ, M.C; KRONKA,R.N.; et al. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringa, v. 26, n. 4, p. 529-536, 2004.
- BROOM, L.J., MILLER, H.M., KERR, K.G., et al. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 1, p. 45-54, 2006.
- CAHILL, R.N.P.; FROST, H.; TRKA, Z. The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 143, 1976.
- CHALLACOMBE, S.J.; TOMASI, T.B.Jr. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 1459, 1980.
- CARLOS, I.Z., VENDRAMINI, A.P., VENDRAMINI, R.C, et al. Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: Prebióticos e probiótico: atualização e prospecção, 2003, Viçosa. **Anais...UFV**, p. 135-154, 2003.
- COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Microingredientes de alimentação animal**. Brasília: CBNA; Sindirações. 45 p, 2004.

- COSTA F.G.P., OLIVEIRA, C.S.F. & BARROS L.R. Valores energéticos do feno de jureminha, feijão bravo e maniçoba para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 813-817, 2007.
- CORASSA, A. **Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos, probióticos e níveis de ácido fólico em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade**. 2004. 65 f Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- CORREA, V.S.; JUNIOR, J.G.C.; VIEITES. F.M.; et al. Probiótico líquido para leitões lactentes em diferentes idades. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 3, 2010.
- CHIQUIERI, J.; SOARES, R. T. R. N.; HURTADO NERY, V. L.; et al. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.2, p. 97-104, 2007.
- FELDMAN B.F., ZINKL J.G.; JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 787p, 2000.
- GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária, Perfil bioquímico sangüíneo**, p. 1-11, 2003.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F.H.D. **Anais... I Simpósio de Patologia Clínica da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre, p. 73-89, 2002.
- HANNAS, M.I. **Plasma suíno e ovo inteiro desidratado em substituição a proteína bruta do leite em pó nas rações de leitões**. 2003. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2003.
- HE F., MORITA H., KUBOTA A., et al. Effect of orally administered non-viable *Lactobacillus* cells on murine humoral immune responses. **Microbiology and Immunology**, v.49, p. 993-997, 2005.
- HERIAS, M.V., HESSLE, C., TELEMO, E., et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. **Clinical Experimental Immunology**, v.116, p.283-290, 1999.
- HUAYNATE, R.A.R. **Probiótico em dietas de suínos**. 2008. 65f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.
- HUSBAND, A.J.; GOWANS, J.L. The origin and antigen dependent distribution of IgA containing cells in the intestine, *The Journal of Experimental Medicine*, v. 148, p. 1140, 1978.
- JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-53, 1993.

- KAGNOFF, M.F. Immunological unresponsiveness after enteric antigen administration, in Recent Advances in Mucosal Immunity. **Raven Press**, New York, p. 95-111, 1982.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J.; BRUSS M. Clinical biochemistry of domestic animals. 5 ed San Diego: Academic Press, 932p, 1997.
- KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic Press, 4.ed, California, 932p, 1989.
- KAMIMURA, R.; ARANTES, V.M.; BELETTI, M.E.; et al. Efeitos de mananoligossacarídeo e colistina sobre a histomorfometria intestinal e níveis de IgA e IgG séricas em leitões. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 153-160, 2006.
- KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W.; FLOWERS, W.L. et al. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig. **Nutrition Research**, v.22, n.10, p. 1209-1217, 2002.
- KIYONO, H., MCGHEE, J.R., WANNEMUEHLER, M.J, et al. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. **Journal of Experimental Medicine**, 155, 605, 1982.
- LESSARD, M.; DUPUIS, N.; GAGNON.; et al. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge, **Journal of Animal Science**, v.87, p. 922-934, 2009
- LI, D.F.; NELSEN, J.L.; REDDY, P.G.; et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pigs. **Journal Animal Science**, v.68, p.1790-1788, 1990.
- LINK, R., KOVÁČ, G., NOVOTNÝ, J., et al. The influence of probiotic preparation with Bacillus on selected haematological and protein parameters in suckling piglets . **Rizikové faktory potravinového řetězce**, 2005.
- MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia Cardiovascular. In: **Fisiologia Aviária aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal SP, p.17-36, 2002.
- MANGONI, J. **Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína**. 2009. 46f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, SBZ, p.141-157, 2001.
- MORAIS M. B.; NETO U. F., Enteropatia Ambiental. **Revista Estudos Avançados da USP**, São Paulo, v. 48, 2003.
- NUNES, A.S.; OLIVEIRA, R.L.; AYRES, M.C, C. Condição hepática de cordeiros mantidos com dietas contendo torta de dendê proveniente da produção de biodiesel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1825-1831, 2010.

- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; HOLGADO, A.P.R. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. **Journal of Dairy Research**, v. 58, p. 485–496, 1991.
- PIEPER, R.; JANCZYK, P.; URUBSCHUROV, V. et al. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. **International Journal of Food Microbiology**, p. 227–232, 2009.
- PINHEIRO, F.M.L. **Estudo sobre fontes de proteína de origem animal e vegetal em dietas para leitões no período de creche**. 2005, Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, 2005.
- RAO, S.O. **Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus*-based probiotics on growth and gut environment of nursery pigs**. 2007. Dissertação (Mestrado). Texas Tech University.
- ROBLES, R. A. H.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; et al. Efeito da adição de probiótico nas dietas de leitões desmamados sobre as proteínas séricas. In: Anais do II Congresso Latino-Americano de Suinocultura. Foz do Iguaçu. **Anais...2007**.
- RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, D. A.O.; TAKETOMI, E.A.; et al. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morphology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.6, 2007.
- RODRIGUES, M.A.A. **Resposta imune e modificações morfológicas de vilosidades intestinais de leitões suplementados com probióticos**. 2002. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 186p, 2005.
- SANTOS, M.S.; FERREIRA, C.L.L.F.; GOMES, P.C.; ET AL. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus sp.* sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciencia agrotecnica**, v.27, n.6, p.1395-1400, 2003.
- SISSONS, J. W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. **Journal of Science Food and Agriculture**, Sussex, v.49, n.1, p.1-13, 1989.
- STATISCAL ANALYSES SYSTEM – SAS. SAS/STAT User's guide. Version 8.2.4.ed.v, 2.Cary: 2000.
- SCHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K.; et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2005.
- SCHIFFRIN, E.J., BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2002.

- STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; et al. *Enterococcus faecium* EK13-anenterosin strain with A- producing probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**, v.12, p.242-248, 2006.
- SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituíntes celulares e químicos do sangue – Capitulo 2. In: Dukes – **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 10. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, p. 13-34, 1984.
- TAKAHASHI, T., NAKAGAWA, E., NARA, T., et al. Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v.62, p.10–15, 1998.
- TIZARD, I. R. *Imunologia Veterinária*. 8ª ed. São Paulo: **Saunders Elsevier**, v. 34, p. 462-466, 2009.
- TIZARD I. *Veterinary Immunology: an introduction*. 4. ed. **Saunders**, Philadelphia. 545p, 1992.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE N.F. **Mineral nutrition of livestock**. 3.ed. Edinburgh: CABI Publishing, 624 p, 1999.
- VITINI, E.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; et al. PERDIGON, G., Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. **Biocell**, v.24, p. 223–232, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro das condições estudadas a administração oral de probiótico, principalmente com células inativadas melhorou o desempenho de leitões do nascimento aos 35 dias de idade.

A ausência de resultados para as contagens microbiológicas, valores do hemograma, níveis séricos de IgA, no quadro seroprotéico e nos níveis de glicose dos leitões nas fases de lactação e de creche sugerem a necessidade de mais estudos com o intuito de elucidar os fatores que podem interferir na resposta aos probióticos.