

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

ELISEU CARLOS CRISTOFORI

Probióticos em rações comerciais para leitões na fase de creche

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
2016

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

ELISEU CARLOS CRISTOFORI

Probióticos em rações comerciais para leitões na fase de creche

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

Orientador Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira
Coorientador Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

C933p	<p>Cristofori, Eliseu Carlos</p> <p>Probióticos em rações comerciais para leitões na fase de creche / Eliseu Carlos Cristofori. - Marechal Cândido Rondon, 2016. 44 f</p> <p>Orientador: Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira Coorientador Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho</p> <p>Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016.</p> <p>1. Suíno. 2. Suíno - Alimentação e rações. 3. Probióticos. I. Oliveira, Newton Tavares Escocard de. II. Carvalho, Paulo Levi de Oliveira. III. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 636.4 CIP-NBR 12899</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539

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

ELISEU CARLOS CRISTOFORI

Probióticos em rações comerciais para leitões na fase de creche

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

Marechal Cândido Rondon, 31 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira
Orientador – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho
Coorientador – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.^a Dr.^a Cinthia Eying
Membro da banca – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha
Membro da banca – Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Avelino e Aonelia Cristofori,
dedico este trabalho e todas as conquistas que virão...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por iluminar meus passos.

À minha família, em especial meus pais Avelino e Aonelia Cristofori, pelo incentivo e apoio para realização deste trabalho. Aos meus irmãos Marcos, Jaime e Jeovani, pelo companheirismo e torcida para que tudo desse certo.

À minha namorada, Jailine Fiorentin, pela sua paciência e incentivo para conclusão do mestrado.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade desde a graduação até agora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Newton Tavares Escocard de Oliveira, pela orientação, ensinamentos e amizade.

Ao professor Paulo Levi de Oliveira Carvalho, pela coorientação, ensinamentos, confiança e amizade.

À Cooperativa Copagril, pelo fornecimento dos animais, ração e aditivos utilizados.

Ao grupo de estudos e pesquisa em suínos GEP'S, pela dedicação e colaboração para realização do experimento. Em especial à Ana Lucia de Almeida Santana pelos seus ensinamentos repassados, dedicação, compromisso e paciência.

Aos funcionários da fazenda experimental, pelo auxílio nas atividades durante o período experimental.

Aos professores Cinthia Eyng, Leandro Dalcin Castilha e Aparecida da Costa Oliveira, pelos ensinamentos e contribuições para este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista.

Digestibilidade de ração comercial com adição de diferentes probióticos em leitões aos 63 dias de idade e desempenho na fase de creche

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a digestibilidade, quantificação de Clostrídeos e CBT das fezes, desempenho e variáveis sanguíneas em leitões alimentados com dois probióticos diferentes. Os experimentos foram realizados no Setor de Suinocultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Para a digestibilidade foram utilizados 24 suínos machos inteiros com peso vivo inicial de $18,8 \pm 0,87$ kg, que foram alojados individualmente em gaiolas de metabolismo, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos e oito repetições por tratamento. Os tratamentos foram: ração comercial isenta de probiótico; ração comercial com adição do probiótico A e ração comercial com adição do probiótico B. Foi avaliada a digestibilidade das rações e no final do experimento foi coletado 25 gramas de fezes para análise microbiológica de *Clostridium* e contagem bacteriana total. Para o segundo experimento, foram utilizados 150 leitões, fêmeas e machos inteiros, mestiços, desmamados aos 21 dias de idade com peso médio inicial de $6,81 \pm 0,71$ kg distribuídos em delineamento experimental de blocos casualizados em arranjo fatorial 3×2 , constituído de três dietas experimentais e dois sexos. As rações foram as mesmas do experimento 1. Foi avaliado o desempenho durante a fase de creche, dividida em fases: Pré inicial I (21 – 29 dias de idade); Pré inicial II (30 – 40 dias de idade); Inicial (41 – 63 dias de idade) e período total (21 – 63 dias de idade). Ao final de cada fase foram coletadas amostras de sangue para avaliação de cálcio, fósforo e uréia no soro. Para a digestibilidade foram encontrados resultados significativos ($p < 0,05$) entre tratamentos para a proteína bruta digestível onde que os probióticos melhoraram a digestibilidade. Nas análises microbiológicas foi encontrado valores significativos ($p < 0,05$) para contagem bacteriana total em que o probiótico A diminuiu a contagem. Para desempenho não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre tratamento em nenhuma das fases. Foi encontrado diferença estatística ($P < 0,05$) para comparação de sexo no desempenho no período total em que os machos foram superiores as fêmeas. Na análise de cálcio sanguíneo, houve diferença estatística ($P < 0,05$) apenas para a fase Pré inicial II, onde que os machos alimentados com o probiótico B apresentou menor valor que os demais. Na análise de fósforo sanguíneo houve diferença ($P < 0,05$) apenas para a fase Pré inicial I, onde que os machos alimentados com A apresentou maiores valores em relação aos demais. O uso dos probióticos melhoram a digestibilidade da proteína bruta da ração e reduz a população de bactérias totais

presentes nas fezes. Para desempenho os probióticos não foram eficientes, e para análise sanguínea não apresentaram correlação significativa.

Palavras chave: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, levedura

Digestibility of commercial diet with addition of different probiotics for piglets from 21 to 63 days of age and performance in the nursery phase

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the digestibility, microbiological composition of the feces, performance and blood parameters in piglets fed two different probiotics. The experiments were performed in the swine industry of the State University of Western Paraná. For digestibility assay, 24 pigs with initial weight of 18.8 ± 0.87 kg were housed individually in metabolism cages, distributed in a completely randomized experimental design consisting of three treatments and eight replicates per treatment. The treatments were: commercial diet free of probiotics; commercial diet with added probiotic Protexin and commercial diet with addition of probiotic Levucell. Digestibility of diets were evaluated and 25 grams of feces was collected for microbiological analysis of *Clostridium* and total bacterial count at the end of the assay. For the second experiment, 150 crossbred piglets (barrows and gilts) were used, weaned at 21 days of age with an average initial weight of 6.81 ± 0.71 kg. Animals were distributed in a randomized block in factorial arrangement 3×2 , consisting of three experimental diets and both sexes. The diets were the same of experiment 1. We assessed performance during the nursery phase divided into phases: Pre initial I (21-29 days of age); Pre starter II (30 - 40 days of age); Initial (41-63 days of age) and total period (21 - 63 days of age). During each phase blood samples were collected for evaluation of calcium, phosphorus and urea in serum. The digestibility results were found significant ($p < 0.05$) between treatments for digestible crude protein in which the probiotic improved digestibility. Microbiological analysis found significant differences ($p < 0.05$) for total bacterial count of the probiotic Protexin, which decreased counting. For performance, there were no statistical differences ($p > 0.05$) between treatment at any stage. There was a difference ($p < 0.05$) for sex comparison in performance over the entire period in which males were higher than females. In blood calcium analysis, there was no statistical difference ($p < 0.05$) for the Pre initial phase II, where males fed probiotic Levucell showed lower value than the others. In blood phosphorus analysis there was difference ($p < 0.05$) for the Pre initial phase I, where males fed Protexin showed higher values than the other. The use of probiotics improve digestibility of dietary crude protein and reduces the population of total bacteria present in feces. For performance, the probiotics were not effective, and blood analysis showed no significant correlation.

Keywords: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, yeast

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Revisão de literatura	14
2.1 Probióticos	14
2.2 Neutralização das toxinas	15
2.3 Competição por locais de adesão	15
2.4 Probióticos e imunidade.....	16
2.5 Probióticos e resultados zootécnicos	17
2.5 Leveduras.....	18
3. Digestibilidade de ração comercial com adição de diferentes probióticos em leitões aos 63 dias de idade e desempenho na fase de creche	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.4 CONCLUSÃO	42
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição química das rações quanto ao seu respectivo nível de garantia	29
Tabela 2 - Composição nutricional das rações comerciais e seus respectivos níveis de garantia	32
Tabela 3 - Coeficientes de digestibilidade (CD) e valores de nutrientes digestíveis e energia digestível das dietas contendo diferentes tipos de probiótico ¹	34
Tabela 4 - Valores médios de log (base dez) de contagem bacteriana total (CBT) e contagem microbiológica para <i>Clostridium</i> nas fezes de leitões machos alimentados com diferentes probióticos ¹	35
Tabela 5 - Valores de médias de quadrados mínimos (<i>lsmeans</i>) das características de desempenho (kg) de leitões, de acordo com as combinações entre classes de probiótico e de sexo, no decorrer do experimento ¹	36
Tabela 6 - Comparações entre médias de quadrados mínimos (<i>lsmeans</i>) das características de desempenho (kg) nas fases de desenvolvimento, de acordo com o sexo dos suínos ¹	37
Tabela 7 - Valores de médias de quadrados mínimos (<i>lsmeans</i>) do cálcio sanguíneo (mg/dL), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de classes de fonte de probiótico e de sexo ¹	38
Tabela 8 - Valores de médias de quadrados mínimos (<i>lsmeans</i>) do fósforo sanguíneo (mg/dL), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de classes de fontes de probiótico e de sexo ¹	40
Tabela 9 - Valores de médias ajustadas de quadrados mínimos (<i>lsmeans</i>) da raiz quadrada da ureia sanguínea (µg/mL), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de classes de fonte de probiótico e de sexo ¹	40
Tabela 10 - Valores de médias de quadrados mínimos (<i>lsmeans</i>) do cálcio, fósforo (mg/dL) e da raiz quadrada da ureia sanguínea (µg/mL), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de sexo	41

1. Introdução

Na suinocultura industrial, o desmame é um período crítico na vida do leitão devido ao estresse nutricional, social e ambiental. Isso ocorre em razão de mudanças no período pós desmame em que a dieta é alterada, uma vez que os animais recebiam uma dieta de alta digestibilidade pela ingestão de leite e passam a receber uma dieta menos digestível com a ração sólida, podendo ocorrer transtornos ao intestino do animal, o que gera importantes perdas econômicas na suinocultura.

Uma perda de peso passageira, como geralmente é observado logo após essa fase, leva a uma disfunção no intestino, como sensibilidade aumentada a infecções entéricas e diarreia, ocasionando modificações nas vilosidades intestinais. Alterações fisiopatológicas modificam a anatomia e a função do intestino delgado, com redução de 20 a 30% do peso vivo associado à atrofia das vilosidades na mucosa (LALLE's et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que a função da barreira intestinal fica comprometida, resultando no aumento da secreção de eletrólitos e água, e aumento da permeabilidade para substâncias potencialmente tóxicas (LALLE's et al., 2004). O desmame ainda causa alterações na fisiologia do intestino e distúrbios na homeostase da microbiota e desenvolvimento das mucosas (LALLE's et al., 2007).

Para prevenir essas perdas econômicas geradas pelo estresse ao desmame, surgiram os antibióticos, que têm sido utilizados como promotores de crescimento. Contudo, os possíveis efeitos secundários dos antibióticos alertam os consumidores e os fabricantes de alimentos para animais a buscarem outras alternativas de aditivos para ração animal (KABIR, 2009). Uma alternativa encontrada em substituição aos antibióticos é o uso de probióticos (GRIGGS e JACOB, 2005), que em definição são microrganismos vivos, e quando administrados de forma correta atuam em benefício da microbiota intestinal, promovendo melhores índices zootécnicos (FULLER e COLE, 1989).

Vários microrganismos têm sido utilizados como probióticos e diversos trabalhos são encontrados na literatura avaliando a eficiência dos mesmos. Wang et al. (2012) utilizaram probiótico à base de *Lactobacillus acidophilus* e *Pediococcus acidilactici* em suínos ao desmame e verificaram melhora no desempenho. Datt et al (2011), em experimento utilizando probiótico à base de *Lactobacillus* e de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram aumento na digestibilidade e maior taxa de crescimento em suínos na fase de crescimento. Bontempo et al. (2006) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em experimento com

suínos na fase de desmame e verificaram maior ganho de peso. Shen et al (2009) avaliaram a *Saccharomyces cerevisiae* em leitões na fase de creche e encontraram menores contagens de *Escherichia coli* na microbiota intestinal.

Apesar de haver trabalhos com resultados positivos no uso dos probióticos, também são encontrados trabalhos na literatura em que os autores não encontraram diferença entre os tratamentos. Com isso, esta pesquisa tem por objetivo a avaliação de dois probióticos adicionados à ração comercial de leitões, na fase de creche, para variáveis de desempenho, digestibilidade da ração, microbiologia fecal e parâmetros sanguíneos.

2. Revisão de literatura

2.1 Probióticos

A primeira definição para probióticos foi feita por Lilly e Stillwell (1965), que os descreveram como substâncias produzidas por protozoários, que estimulam o crescimento de outros microrganismos. Posteriormente, vários trabalhos foram realizados objetivando verificar essa ação probiótica. Parker (1974) definiu como microrganismo ou substância que contribui para o equilíbrio microbiano intestinal. Weichselbaum (2009) definiu os probióticos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas.

Na literatura são encontradas várias definições e atualmente a mais aceita é que os probióticos são microrganismos vivos e, quando administrados de forma adequada, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro.

Huyghebaert et al. (2011) classificaram os probióticos em duas classes: as espécies colonizadoras (*Lactobacillus* e *Enterococcus* spp.), e não colonizadoras, de trânsito intestinal livre (*Bacillus* spp. e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*).

Para um microrganismo ser considerado probiótico ele deve atender algumas características como: fazer parte da flora intestinal normal do hospedeiro; sobreviver e colonizar rapidamente o intestino do hospedeiro; ser capaz de aderir ao epitélio intestinal do hospedeiro; sobreviver à ação de enzimas digestivas; ter ação antagonista aos microrganismos patogênicos (BRITO et al., 2013), não ser tóxico ou patogênico; ser cultivável em escala industrial; ser estável e viável na preparação comercial e estimular a imunidade (FULLER et al., 1989).

Várias espécies de bactérias podem ser caracterizadas como probióticas, porém as cepas ácidoláticas são consideradas mais importantes para a nutrição e a alimentação (HOLZAPFEL et al., 2001). Assim, para compor esse grupo, as bactérias devem ser Gram-positivas, não esporulantes, cocos ou bastonetes “não respirantes”, e que durante a fermentação de carboidratos produzam o ácido lático como principal produto final (AXELSSON, 2005). As três principais classes consideradas como probióticas são os *Bacillus*, as leveduras e as bactérias produtoras de ácido lático, como os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (STEIN e KIL, 2006).

Em um aspecto geral, os probióticos adicionados na alimentação de monogástricos promovem melhores índices econômicos através de maior produtividade pelo aumento do ganho de peso e melhoria da conversão alimentar. O aumento do índice de desempenho zootécnico pode estar associado à redução da contaminação por agentes patogênicos,

principalmente *Salmonella* sp., no trato gastrointestinal do animal (VILÀ et al., 2009) e à melhora da imunidade (KHAKSEFIDI, 2006).

Modo de ação dos probióticos

2.2 Neutralização das toxinas

No trato gastrointestinal existem várias toxinas que são produzidas por diversos microrganismos patogênicos. Quando são utilizados probióticos, a quantidade desses microrganismos patogênicos é reduzida e a produção de toxinas é diminuída (HOOPER e MACPHERSON, 2010; MURALI et al., 2010). Segundo Vilà et al. (2010), os *Lactobacillus acidophilus* produzem metabólitos como acidophilin, lactocidin e acidolin, e os *Lactobacillus plantarum* produzem lactolin. As leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, atuam reduzindo a quantidade disponível de toxinas secretadas pelos patógenos por meio da concorrência pelo local de adesão.

Geralmente as toxinas ligam-se a receptores específicos nas células do epitélio intestinal e induzem a alterações resultantes da perda de água e eletrólitos. Certas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* podem excretar uma serina-protease que hidrolisa as toxinas produzidas por *Clostridium difficile*, que é resistente à tripsina e inibe a ligação da toxina ao seu receptor glicoproteico na borda em escova (CASTAGLIULO et al., 1996).

Os probióticos também podem inibir os agentes patogênicos pelo aumento na função da barreira intestinal através da modulação do citoesqueleto e forte junção das proteínas (SHERMAN et al., 2005).

2.3 Competição por locais de adesão

A exclusão competitiva é a habilidade da microbiota se proteger dos efeitos nocivos estabelecidos pelos agentes patogênicos (CHO et al., 2011). A competição de espaço para as bactérias exógenas se aderirem entre o espaço das bactérias endógenas no lúmen intestinal resultam na chamada exclusão competitiva de patógenos exógenos (BROWN, 2011). O conceito da exclusão competitiva indica que as culturas de microrganismos benéficos selecionados adicionados à alimentação competem com as bactérias nocivas com relação aos locais de adesão e no substrato, principalmente fontes de carbono e energia.

Probióticos podem excluir as bactérias patogênicas de duas maneiras: inicialmente competem por nutrientes e locais de absorção com os microrganismos patogênicos e assim impedem a sua proliferação maléfica no intestino (BROWN, 2011; MALAGO e KONINKX, 2011). Após o estabelecimento no intestino, produzem substâncias como lisozima, peróxido de hidrogênio, entre outros ácidos orgânicos, e ácidos graxos voláteis com propriedades

bactericidas ou bacteriostáticas, que acidificam o meio, prejudicando a sobrevivência das bactérias patogênicas como a *Escherichia coli* e *Salmonella* (BROWN, 2011).

A adesão das bactérias nas células epiteliais é a fase inicial da infecção bacteriana nas mucosas. As bactérias possuem uma ligação molecular na sua superfície que é capaz de interagir especificamente com a membrana da célula hospedeira, de maneira análoga à interação entre antígenos e anticorpos. Determinadas estirpes de *E. coli* ou *Salmonella* possuem uma adesina fimbrial que se liga a resíduos de manose em membranas das células epiteliais (OFEK et al., 1977). Essas bactérias ou suas fímbrias isoladas também aglutinam levedura contendo manose na camada exterior da sua parede celular (KORHONEN, 1979). Gedek (1989) relatou que a ligação de agentes patogênicos de parede celular com a levedura induz um efeito protetor. A concorrência entre levedura e patógenos para a ligação das células intestinais pode ajudar a explicar a ação benéfica da levedura, uma vez que esta adesão é crucial para a expressão do efeito citopatogênico.

2.4 Probióticos e imunidade

A distinção entre as bactérias benéficas e maléficas não são bem esclarecidas. Uma grande variedade de microrganismos intestinais, que normalmente são comensais, pode em algum momento tornar-se ameaça ao hospedeiro. Com isso, as bactérias patogênicas no lúmen intestinal precisam ser interrompidas por uma resposta imune agressiva (BISWAS e KOBAYASHI, 2013).

O desafio para o sistema imunitário do intestino é proteger os tecidos do hospedeiro a partir da invasão microbiana e, ao mesmo tempo, manter a presença da simbiose microbiana (HOOPER et al., 2012). A tolerância em relação à microbiota no lúmen intestinal é conseguida por meio de células que apresentam amostragem contínua de antígenos no lúmen intestinal e apresentam essas amostras para as células do sistema imunológico no córtex do tecido linfóide associado ao intestino. Pesquisa realizada por Nagano et al. (2012), concluíram que microrganismos da família *Clostridiaceae*, pertencentes ao filo *Firmicutes*, desempenham um papel essencial no estabelecimento da tolerância de resposta pela indução de regulação dos linfócitos T.

Estudos recentes realizados por Kotzampassi e Giamarellos, (2012) e por Power et al. (2014) indicaram que a microbiota intestinal possui influência direta sobre a saúde do hospedeiro como alterações metabólicas, fisiológicas, nutricionais e processos imunológicos.

Segundo Fleige et al. (2009), os probióticos atuam tanto modulando a resposta imune inata como a adquirida, favorecendo o combate aos microrganismos patogênicos. Os

probióticos fornecidos na alimentação animal modulam a resposta humoral e celular para aumentar a proteção pelo sistema imunológico (LEE et al., 2010) e estimulam a produção de anticorpos e ativação dos linfócitos (NG et al., 2009).

2.5 Probióticos e resultados zootécnicos

A digestibilidade dos nutrientes pode ser melhorada com uso dos probióticos devido à sua capacidade de produzir e excretar enzimas como as proteases (WESTERS et al., 2004; HARWOOD e CRANENBURGH, 2008) e amilases (WESTERS et al., 2004; VIDYALAKSHMI et al., 2009). A grande maioria das proteases existentes no mercado são derivadas dos *Bacillus* (JOO et al., 2004) devido à sua facilidade de manipulação genética e grande diversidade bioquímica. Essas bactérias possuem grande capacidade de secretar as enzimas em médias a altas concentrações no meio. As espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* produzem as enzimas α -amilase, protease alcalina (CHAUD et al., 2007) e protease neutra (SHULZ et al., 2009).

Pieper et al. (2010) investigaram a ação do probiótico *Lactobacillus plantarum* em várias administrações por semana. Eles descobriram que a administração única de 5×10^9 UFC de *L. plantarum* na desmama de leitões aumentou a concentração de ácido lático e bactérias produtoras de butirato no cólon, em comparação com suínos que receberam *L. plantarum* três dias antes da desmama.

Os Lactobacilos e as Bifidobactérias são responsáveis pela fermentação dos carboidratos e como resultado final ocorre a produção de ácido lático no intestino dos animais. O ácido lático diminui o pH do meio, dificultando o crescimento e desenvolvimento de bactérias patogênicas.

Lojanica et al. (2010) avaliaram o desempenho de leitões na fase inicial utilizando *Enterococcus faecium* como probiótico na dieta e encontraram resultados positivos para o uso do aditivo. Os animais que consumiram o probiótico apresentaram melhor conversão alimentar em relação ao tratamento testemunha (1,78 e 2,38, respectivamente) assim como o ganho de peso diário (459 e 327 g, respectivamente), e menor mortalidade com uso do probiótico (2,65 e 4,76% respectivamente).

Giang et al. (2012) encontraram valores positivos para desempenho, digestibilidade e incidência de diarreia em leitões de 3 a 5 semanas pós desmame utilizando probióticos na dieta. O ganho diário de peso dos animais suplementados foi superior (419 g) aos não suplementados (332 g) assim como uma melhora na conversão alimentar (1,81 e 2,13 respectivamente). Para digestibilidade os autores encontraram resultado maior para PB em dieta suplementada (0,84) em comparação aos animais não suplementados (0,75). O mesmo ocorreu para matéria orgânica

(0,81 e 0,73). A incidência de diarreia foi menor em animais suplementados (4,5%) em comparação aos não suplementados (17 %).

2.5 Leveduras

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie que tem sido usada durante séculos para uma variedade de processos, incluindo a panificação. Com o passar do tempo a levedura foi utilizada como um suplemento na alimentação para bovinocultura leiteira (THRUNE et al., 2009; SANCHEZ et al., 2013), suinocultura, ovinocultura (TRIPATI e KARIM, 2011) e avicultura (DAWSON, 2001), devido a razões que englobam melhoria no desempenho e benefícios para a saúde e bem estar animal (BEAUCHEMIN et al., 2008).

Sua composição é formada principalmente por polissacarídeos presentes na parede celular como, α -D-glucana e β -D-glucana (KOGAN e KOCHER, 2007). Esses componentes interagem diretamente com as células do sistema imunológico e também são capazes de ligarem-se a bactérias e outros agentes patogênicos, impedindo sua colonização no trato gastrintestinal. Além dos benefícios contra os patógenos, a parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* possui propriedades antioxidantes (KOGAN et al., 2005) e antitumorais (KHALIKOVA et al., 2005). Componentes da parede celular de leveduras foram relatados como estimulantes da liberação de citocinas a partir de macrófagos (MAJTÁN et al., 2005) e podem estar envolvidos com a modulação de células imunes em muitas espécies (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000).

Leveduras e componentes derivados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são imunomoduladores que interagem direta e indiretamente com patógenos e os componentes do sistema imunitário (KOGAN e KOCHER, 2007) e podem estar envolvidos na síntese e liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α de macrófagos (MAJTÁN et al., 2005) e envolvida na liberação de outras citocinas como IL-1, IL-2 e IL-6 (BROWN, 2006). O polissacarídeo β -glucano, classificado como um modificador de resposta biológica (BOHN e BEMILLER, 1995), tem sido relatado por aumentar a funcionalidade dos macrófagos e neutrófilos (WILIAMS et al., 1996).

O aumento de linfócitos T tem sido relatado em suínos suplementados com leveduras na dieta. Outros estudos relataram alterações de resposta na fase aguda (especificamente IL-6 e cortisol) em novilhas confinadas suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* (SANCHEZ et al., 2013). Além disso, Eicher et al. (2006) relataram o aumento das concentrações de TNF- α em múltiplos tecidos em suínos suplementados com levedura durante um desafio lipopolissacarídico. Assim, as leveduras podem modular e alterar a produção de citocinas e

ativação do sistema imunológico em animais possivelmente devido ao efeito de síntese de β -glucanos em células imunitárias.

Em suínos jovens, o sistema imunológico e a produção de citocinas foi estimulado em idade mais precoce quando suplementados com levedura (EICHER et al., 2006). White et al. (2002) relataram redução na colonização de coliformes em todo o trato gastrointestinal. Além disso, segundo os mesmos autores, a suplementação com levedura seca de cervejaria foi relatada por melhorar a imunidade em leitões recém desmamados.

Embora a suplementação com levedura possa aumentar diretamente o estado de saúde animal, Shen et al. (2011) relataram que a suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* para porcas em gestação pode influenciar na saúde da prole subsequente, alterando a hematologia, especificamente os neutrófilos. Além disso, os pesquisadores relataram efeitos positivos sobre o sistema imunológico em leitões desmamados alimentados com derivados de produtos da fermentação de levedura.

Além do fator imunológico que as leveduras proporcionam, elas ainda podem ser utilizadas na ração animal como fonte de proteína, substituindo o farelo de soja. Entretanto existem algumas dificuldades no seu uso devido à presença da parede celular que representa até 50% do peso da célula. Uma solução para melhorar a digestibilidade é realizar a hidrólise da levedura por meio de enzimas que quebram uma parte da estrutura da parede celular, permitindo melhor digestão e exposição do conteúdo celular. Com esse procedimento a digestibilidade total é aumentada, entretanto se remover totalmente a parede celular da levedura, o seu teor de proteína aumenta. A remoção completa da parede celular da levedura forma o extrato de levedura. A proteína do extrato de levedura é altamente digestível e seu teor de PB varia de 47 a 50%, semelhante ao farelo de soja (FEGAN, 2007).

Além de ser fonte de proteína, o extrato de levedura tem efeito na dieta como palatabilizante devido à presença de glutamato (TIBBETS, 2000), é fonte de inositol (D'SOUZA e FRIO, 2007) e de nucleotídeos que são precursores dos ácidos nucleicos RNA e DNA, além de atuarem melhorando a imunidade do animal (UAUY, 1994) e aumentar a altura e espessura das vilosidades intestinais (TIBBETS, 2002). A suplementação com derivado de levedura melhora o desempenho, a capacidade antioxidante e a resposta imunológica em leitões (SUPERCHI et al., 2012; SAUER et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. et al. **Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2005.
- BEAUCHEMIN, K.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; McAllister, T. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Animal Production Science**, v. 48, p. 21–27, 2008.
- BISWAS, A.; KOBAYASHI, K.S. Regulation of intestinal microbiota by the NLR protein family. **International Immunology**, v. 25, p. 207–214, 2013.
- BOHN, J.A.; BEMILLER, J.N. (1→3)- β -D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3–14, 1995.
- BONTEMPO, V.; GIANCAMILLO, A.D.; SAVOINI, G. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, p. 224-236, 2006.
- BRITO, M.B., PLAZA, J.D., FONTANA, L. et al. In vitro cell and tissue models for studying host–microbe interactions: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 23–34, 2013.
- BROWN, M. Modes of action of probiotics: Recent developments. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 1895-1900, 2011.
- BROWN, G.D. Dectin-1: A signalling non-tlr pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 33–43, 2006.
- CASTAGLIULO, I.; LACANT, T.; NIKULASSAN, S.T. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 5225-5232, 1996.
- CHAUD, L.C.S., VAZ, P., FELIPE, M.G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v.4, n.1-2, p. 87-97, 2007.
- CHO, J.H.; ZHAO, P.Y.; KIM, I.H. Probiotics as a dietary additive for pigs: a review. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 2127-2134, 2011.
- DATT, C.; MALIK, S.; DATTA, M. Effect of probiotics supplementation on feed consumption, nutrient digestibility and growth performance in crossbred pigs under Tripura climate. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v. 28, p. 331-335, 2011.
- DAWSON, K. The application of yeast and yeast derivatives in the poultry industry. **Australian Poultry Science Symposium**, v. 13, p. 100–105, 2001.
- D'SOUZA, D.; FRIO, A. Bridging the post-weaning piglet growth gap: the NuPro experience in the Asia Pacific region. In: LYONS, T.P.; JAQUES, K.A. **Proceedings of Alltech's 23rd Annual Symposium**. Nottingham, UK: Nottingham University Press. p. 41-48, 2007.
- EICHER, S.D.; MCKEE, C.A.; CARROLL, J.A. et al. Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2352-2360, 2006.
- FEGAN, D.F. Funcional foods for aquaculture: benefits of NuPro and dietary nucleotides in aquaculture feeds. Disponível: <http://en.engormix.com/MA-aquaculture/articles/functional-foods-aquaculture-benefits-t604/141-p0.htm>, 2007.
- FLEIGE, S.; PREIBINGER, W.; MEYER, H.H.D. et al. The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 1731-1738, 2009.
- FULLER, R.; COLE, E.C.B. The scientific basis of the probiotic concept. In: STARK, B.A.; WILKINSON, J. M. (Ed.). **Probiotics: theory and applications**. [Marlow]: Chalcombe Publications, p. 1-14, 1989.

- GEDEK, B. **Interaktion zwischen lebenden Hefezellen und darmpathogenen Escherichia coli-keimen.** In: *Okosystem Darm, Morphologie, Mikrobiologie, Immunologie*, Müller, J., Ottenjann, R. and Seifert, J. (eds). Springer Verlag, p. 135-139, 1989.
- 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 a complex of acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. **Livestock Science**, v. 143, p. 132-141, 2012.
- GRIGGS, J.P.; JACOB, J.P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, p. 750–756, 2005.
- HARWOOD, C.R. & CRANENBURGH, R. Bacillus protein secretion: an unfolding story. **Trends in Microbiology**, v.16, 2008.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365-373, 2001.
- HOOPER, L.V.; MACPHERSON, A.J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 159–169, 2010.
- HOOPER, L.V.; LITTMAN, D.R.; MACPHERSON, A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, p. 1268–1273, 2012.
- HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F.V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 182-188, 2011.
- JOO, H.S., KUMAR, C.G., PARK, G.C. et al. Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* spp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1441-1447, 2004.
- KABIR, S.M.L. The role of probiotics in the poultry industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3531–3546, 2009.
- KHAKSEFIDI, A.; GHOORCHI, T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. **Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 296-300, 2006.
- KHALIKOVA, T.A.; ZHANAEVA, S.Y.; KOROLENKO, T.A. et al. Regulation of activity of cathepsins B, L, and D in murine lymphosarcoma model at a combined treatment with cyclophosphamide and yeast polysaccharide. **Cancer Letters**, v. 223, p. 77–83, 2005.
- KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161–165, 2007.
- KOGAN, G.; STAŠKO, A.; BAUEROVÁ, K. et al. Antioxidant properties of yeast (1→3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 18–28, 2005.
- KORHONEN, T.K. Binding specificity of pilated strains of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* to epithelial cells. **Microbiology Letter**, v. 6, p. 421, 1979.
- KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELLOS, E.J. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 288-96, 2012.
- LALLE'S, J.P.; BOUDRY, G.; FAVIER, C. et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Animal Research**, v. 53, p. 301–316, 2004.
- LALLE'S, J.P.; BOSI, P.; SMIDT, H. et al. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, p. 260–268, 2007.
- LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact in the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal Poultry Science**, v. 47, p. 106-114, 2010.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

- LOJANICA, M.; MANOJLOVIC, M.; JEREMIC, D. The effects of probiotic *Enterococcus faecium* DSM 7134 in the weaned pigs nutrition. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 26, p. 57-64, 2010.
- MAJTÁN, J.; KOGAN, G.; KOVÁCOVÁ, E. et al. Stimulation of TNF-alpha release by fungal cell wall polysaccharides. **Zeitschrift Naturforschung**, v. 60, p. 921–926, 2005.
- MALAGO, J.J.; KONINKX, J.F.J.G. Probiotic-pathogen interactions and enteric cytoprotection. **Biomed Probiotic Bacteria and Enteric Infection**, v. 6, p. 289-311, 2011.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **Nutrition England Journal Medicine**, v.343, p. 338–344, 2000.
- MURALI, S.E.; KAVITHA, B.T.V.V.; SRIKANTH, J.G.I. Probiotics as potential therapies in human gastrointestinal health. **International Journal of Advance Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 96-110, 2010.
- NAGANO, Y.; ITOH, K.; HONDA, K. The induction of Treg cells by gut-indigenous *Clostridium*. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, p. 392–397, 2012.
- NG, S.C.; HART, A.L.; KAMM, M.A. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, p. 300-310, 2009.
- OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, v. 265, p. 623-625, 1977.
- PARKER, R.B. Probiotics, the Other Half of the Antibiotic Story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.
- PIEPER, R.; JANCZYK, P.; URUBSCHUROV, V. et al. 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.
- POWER, S.E.; O'TOOLE, P.W.; STANTON, C. et al. Intestinal microbiota, diet and health. **British Journal Nutrition**, v. 111, p. 387-402, 2014.
- SAUER N.; EKLUND M.; ROTH S. et al. Short-term effect of dietary yeast nucleotide supplementation on small intestinal enzyme activities, bacterial populations and metabolites and ileal nutrient digestibilities in newly weaned pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, p. 700–708, 2012.
- SANCHEZ, N.C.B.; YOUNG, T.R.; CARROLL, J.A. et al. Yeast cell wall supplementation alters aspects of the physiological and acute phase responses of crossbred heifers to na endotoxin challenge. **Innate Immunity**, v. 19, p. 411-419, 2013.
- SCHULZ, D., BONELLI, R.R., BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 16, p. 403-411, 2009.
- SHERMAN, P.M.; HENRY, K.C.; YEUNG, H.P. et al. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5183-5188, 2005.
- SHEN, Y.; PIAO, X.S.; KIM, S.W. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 2614-2624, 2009.
- SHEN, Y.; CARROLL, J.; YOON, I. et al. Effects of supplementing fermentation product in sow diets on performance of sows and nursing piglets. **Journal of Animal Science**. v. 89, p. 2462–2471, 2011.
- STEIN, H.H.; KIL, D.Y. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. **Animal Biotechnology**, v. 17, p. 217–231, 2006.
- SUPERCHI P., SALERI R., BORGHETTI P. et al. Effects of dietary nucleotide supplementation on growth performance and hormonal and immune responses of piglets. **Animal**, v. 6, p. 902–908, 2012.

- THRUNE, M.; BACH, A.; RUIZ-MORENO, M. et al. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal PH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. **Livestock Science**, v. 124, p. 261–265, 2009.
- TIBBETS, G.W. Biopeptides in post-weaning diets for pigs: results to date. In: LYONS, T.P and JACQUES, K.A. (ed.) **Biotechnology in the feed industry**: proceedings of Altech's 16 Th anual symposium. Nicholasville: Alltech Technical, p. 347-355, 2000.
- TIBBETS, G.W. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal protein sources in food animal diets. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries**. p. 435-443, 2002.
- TRIPATHI, M.; KARIM, S. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. **Livestock Science**, v. 135, p. 17–25, 2011.
- UAUY, R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 157-159, 1994.
- VIDYALAKSHMI, R., PARANTHAMAN, R., INDHUMATHI, J. Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* spp. **World Journal of Chemistry**, v. 4, p. 89-91, 2009.
- VILÀ, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I. et al. Reduction of *Salmonella enterica* var. *Enteritidis* colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. **Poultry Science**, v. 88, p. 975-979, 2009.
- VILÀ B, E.G.; BRUFAU, J. Probiotic microorganism: 100 years of innovation and efficacy, modes of action. **World Poultry Science Journal**, v. 65, p. 369-380, 2010.
- WANG, J.Q.; YIN, F.G.; ZHU, C. Evaluation of probiotic bacteria for their effects on the growth performance and intestinal microbiota of newly-weaned pigs fed fermented high-moisture maize. **Livestock Science**, v. 145, p. 79-86, 2012.
- WEICHSELBAUM, E. Probiotics and health: a review of the evidence. **Nutrition Bulletins**, v. 34, p. 340-373, 2009.
- WESTERS, L., WESTERS, H., QUAX, W.J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica at Biophysica Acta**, v. 1694, p. 299-310, 2004.
- WHITE, L.; NEWMAN, M.; CROMWELL, G. et al. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2619–2628, 2002.
- WILLIAMS, D.L.; MUELLER, A.; BROWDER, W. Glucan-based macrophage stimulators. **Clinical Immunotherapeutics**, v. 5, p. 392–399, 1996.

3. Digestibilidade de ração comercial com adição de diferentes probióticos em leitões aos 63 dias de idade e desempenho na fase de creche

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a digestibilidade, quantificação de Clostrídeos e CBT das fezes, desempenho e variáveis sanguíneas em leitões alimentados com dois probióticos diferentes. Os experimentos foram realizados no Setor de Suinocultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Para a digestibilidade foram utilizados 24 suínos machos inteiros com peso vivo inicial de $18,8 \pm 0,87$ kg, que foram alojados individualmente em gaiolas de metabolismo, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos e oito repetições por tratamento. Os tratamentos foram: ração comercial isenta de probiótico; ração comercial com adição do probiótico A e ração comercial com adição do probiótico B. Foi avaliada a digestibilidade das rações e no final do experimento foi coletado 25 gramas de fezes para análise microbiológica de *Clostridium* e contagem bacteriana total. Para o segundo experimento, foram utilizados 150 leitões, fêmeas e machos inteiros, mestiços, desmamados aos 21 dias de idade com peso médio inicial de $6,81 \pm 0,71$ kg distribuídos em delineamento experimental de blocos casualizados em arranjo fatorial 3×2 , constituído de três dietas experimentais e dois sexos. As rações foram as mesmas do experimento 1. Foi avaliado o desempenho durante a fase de creche, dividida em fases: Pré inicial I (21 – 29 dias de idade); Pré inicial II (30 – 40 dias de idade); Inicial (41 – 63 dias de idade) e período total (21 – 63 dias de idade). Ao final de cada fase foram coletadas amostras de sangue para avaliação de cálcio, fósforo e uréia no soro. Para a digestibilidade foram encontrados resultados significativos ($p < 0,05$) entre tratamentos para a proteína bruta digestível onde que os probióticos melhoraram a digestibilidade. Nas análises microbiológicas foi encontrado valores significativos ($p < 0,05$) para contagem bacteriana total em que o probiótico A diminuiu a contagem. Para desempenho não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre tratamento em nenhuma das fases. Foi encontrado diferença estatística ($P < 0,05$) para comparação de sexo no desempenho no período total em que os machos foram superiores as fêmeas. Na análise de cálcio sanguíneo, houve diferença estatística ($P < 0,05$) apenas para a fase Pré inicial II, onde que os machos alimentados com o probiótico B apresentou menor valor que os demais. Na análise de fósforo sanguíneo houve diferença ($P < 0,05$) apenas para a fase Pré inicial I, onde que os machos alimentados com A apresentou maiores valores em relação aos demais. O uso dos probióticos melhoram a digestibilidade da proteína bruta da ração e reduz a população de bactérias totais

presentes nas fezes. Para desempenho os probióticos não foram eficientes, e para análise sanguínea não apresentaram correlação significativa.

Palavras chave: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, levedura

Digestibility of commercial diet with addition of different probiotics for piglets from 21 to 63 days of age and performance in the nursery phase

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the digestibility, microbiological composition of the feces, performance and blood parameters in piglets fed two different probiotics. The experiments were performed in the swine industry of the State University of Western Paraná. For digestibility assay, 24 pigs with initial weight of 18.8 ± 0.87 kg were housed individually in metabolism cages, distributed in a completely randomized experimental design consisting of three treatments and eight replicates per treatment. The treatments were: commercial diet free of probiotics; commercial diet with added probiotic Protexin and commercial diet with addition of probiotic Levucell. Digestibility of diets were evaluated and 25 grams of feces was collected for microbiological analysis of *Clostridium* and total bacterial count at the end of the assay. For the second experiment, 150 crossbred piglets (barrows and gilts) were used, weaned at 21 days of age with an average initial weight of 6.81 ± 0.71 kg. Animals were distributed in a randomized block in factorial arrangement 3×2 , consisting of three experimental diets and both sexes. The diets were the same of experiment 1. We assessed performance during the nursery phase divided into phases: Pre initial I (21-29 days of age); Pre starter II (30 - 40 days of age); Initial (41-63 days of age) and total period (21 - 63 days of age). During each phase blood samples were collected for evaluation of calcium, phosphorus and urea in serum. The digestibility results were found significant ($p < 0.05$) between treatments for digestible crude protein in which the probiotic improved digestibility. Microbiological analysis found significant differences ($p < 0.05$) for total bacterial count of the probiotic Protexin, which decreased counting. For performance, there were no statistical differences ($p > 0.05$) between treatment at any stage. There was a difference ($p < 0.05$) for sex comparison in performance over the entire period in which males were higher than females. In blood calcium analysis, there was no statistical difference ($p < 0.05$) for the Pre initial phase II, where males fed probiotic Levucell showed lower value than the others. In blood phosphorus analysis there was difference ($p < 0.05$) for the Pre initial phase I, where males fed Protexin showed higher values than the other. The use of probiotics improve digestibility of dietary crude protein and reduces the population of total bacteria present in feces. For performance, the probiotics were not effective, and blood analysis showed no significant correlation.

Keywords: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, yeast

3.1 INTRODUÇÃO

Dentro do ciclo produtivo de suínos, a fase de creche é considerada o período mais crítico, uma vez que os leitões sofrem um grande estresse decorrente de fatores como a separação da mãe, a adaptação ao novo ambiente, a mudança na alimentação, pois passam a ingerir alimento sólido, e ficam expostos ao estresse social. Além dessas mudanças, nessa fase a proteção adquirida do leite materno, através da ingestão de imunoglobulinas, é retirada do leitão, que ainda não possui imunidade ativa completamente desenvolvida.

Diversos pesquisadores estudaram a microbiota intestinal e encontraram vários microrganismos presentes no meio, bem como seus efeitos ao hospedeiro. Estudos recentes realizados por Kotzampassi e Giamarellos (2012) e Power et al. (2014) observaram que a dinâmica da microbiota intestinal possui influência direta na saúde do hospedeiro, causando alterações metabólicas, fisiológicas, nutricionais e processos imunológicos.

Com isso, pesquisadores têm estudado o uso de alimentos alternativos e de microrganismos benéficos adicionados à dieta, os quais podem beneficiar a microbiota intestinal, como os probióticos. Lilly e Stillwell (1965) definiram pela primeira vez os probióticos como substâncias produzidas por protozoários que estimulam o crescimento de outros microrganismos. Outras definições surgiram posteriormente e atualmente a mais aceita é que os probióticos são um aditivo alimentar à base de microrganismos vivos que, quando administrados de forma adequada, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro.

Para ser considerado um probiótico, o microrganismo deve apresentar algumas características como fazer parte da flora intestinal normal do hospedeiro; sobreviver e colonizar rapidamente o hospedeiro; ser capaz de aderir ao epitélio intestinal; sobreviver à ação de enzimas digestivas; ter ação antagonista aos microrganismos patogênicos; não ser tóxico ou patogênico; ser cultivável em escala industrial; ser estável e viável na preparação comercial e estimular a imunidade (FULLER et al., 1989; BRITO et al., 2013).

Quando adicionados na alimentação de monogástricos, os probióticos podem agir melhorando os índices econômicos, conferindo maior produtividade pelo aumento do ganho de peso e melhoria da conversão alimentar. O aumento do desempenho zootécnico pode ocorrer devido aos probióticos reduzirem a contaminação por agentes patogênicos no trato gastrintestinal do animal, principalmente *Salmonella* spp., e à melhora da imunidade (VILÀ et al., 2009).

Os probióticos possuem ação imunomoduladora no hospedeiro, que ocorre devido à produção de glicopeptídeos ou outros metabólitos. Também possuem efeito nutricional em que

estimulam a produção de enzimas como a lactase e atuam na manutenção saudável das vilosidades intestinais, melhorando a digestibilidade de alimentos e a absorção de nutrientes (LAN et al., 2005).

Lojanica et al. (2010) avaliaram o desempenho de leitões na fase inicial utilizando *Enterococcus faecium* como probiótico na dieta e encontraram melhor conversão alimentar em relação ao tratamento testemunha (1,78 e 2,38, respectivamente) assim como o ganho de peso diário (459 e 327 g, respectivamente), e menor mortalidade (2,65 e 4,76% respectivamente).

Giang et al. (2012) encontraram valores positivos para desempenho, digestibilidade e incidência de diarreia em leitões de 3 a 5 semanas pós desmame utilizando probióticos na dieta. O ganho diário de peso dos animais suplementados foi melhor (419 g) aos não suplementados (332 g) assim como a conversão alimentar (1,81 e 2,13 respectivamente). Para digestibilidade os autores encontraram resultado maior para PB em dieta suplementada (0,84) em comparação aos animais não suplementados (0,75), o mesmo ocorreu para matéria orgânica (0,81 e 0,73). A incidência de diarreia diminuiu em animais suplementados (4,5%) em comparação aos não suplementados (17 %).

Na literatura também são encontrados trabalhos em que os probióticos não alteraram os resultados em experimentos com suínos, como os encontrados por Wang et al. (2012) em que a utilização de *Lactobacillus acidophilus* e *Pediococcus acidilactici* nas dietas, não alteraram os resultados de desempenho em leitões desmamados.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar dois probióticos adicionados em ração comercial para suínos para as variáveis de digestibilidade aparente dos nutrientes da ração em animais de 20 a 30 kg; análise microbiológica das fezes; desempenho dos leitões na fase de creche e parâmetros sanguíneos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Setor de Suinocultura do Núcleo de Estação Experimental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Marechal Cândido Rondon – PR, situado na linha Guará, nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril e Maio de 2015.

Experimento 1

Para o ensaio de metabolismo, foram utilizados 24 suínos, machos inteiros, com peso vivo inicial de $18,8 \pm 0,87$ kg, alojados individualmente em gaiolas de metabolismo semelhantes às descritas por Pekas (1968), distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos, oito repetições e um animal por unidade

experimental. Os tratamentos consistiram da inclusão ou não de probióticos na ração, sendo: ração comercial isenta de probióticos; ração comercial + probiótico A; e ração comercial + probiótico B.

A ração comercial foi fornecida por uma cooperativa local (Tabela 1). Os níveis de garantia dos nutrientes da ração estão próximos dos limites propostos por Rostagno et al. (2011).

Tabela 1 - Composição química das rações quanto ao seu respectivo nível de garantia

Nível de garantia (%)	Inicial
Umidade (Máx.)	12,0
Proteína Bruta (Mín.)	20,0
Extrato Etéreo (Mín.)	5,0
Matéria Mineral (Máx.)	6,0
Lisina (Mín.)	1,35
Metionina (Mín.)	0,485
Fibra Bruta (Max.)	3,5
Colistina ppm	40,0

A ração foi fornecida à vontade aos animais, duas vezes ao dia, sendo uma de manhã e a outra à tarde. Para estimular o consumo, a ração foi umedecida com 20% de água. Durante o período de coleta, o consumo de ração foi calculado pelo peso metabólico do animal ($PV^{0,75}$).

A composição dos probióticos foi a seguinte: probiótico A (UFC/g): *Lactobacillus plantarium* ($1,26 \times 10^8$), *L. bulgaricus* ($2,06 \times 10^8$), *L. acidophilus* ($2,06 \times 10^8$), *L. rhamnosus* ($2,06 \times 10^8$), *Bifidobacterium bifidum* ($2,00 \times 10^8$), *Streptococcus thermophilus* ($4,10 \times 10^8$) e *Enterococcus faecium* ($6,46 \times 10^8$), utilizando recomendação de 200 g/t de ração.

O probiótico B é constituído pela levedura *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, com garantia mínima de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/g, utilizada recomendação de 100 g/t de ração.

O período experimental teve duração de aproximadamente 10 dias, sendo cinco dias para a adaptação dos animais às gaiolas de metabolismo e as rações experimentais e cinco dias de coleta total de fezes e urina.

As coletas de fezes e urina foram realizadas uma vez ao dia. Para definir o início e o final do período de coleta foi adicionado 1% de óxido férrico (Fe_2O_3) como marcador na ração. Os procedimentos para coleta de fezes e urina foram realizados segundo Sakomura e Rostagno (2007).

As fezes foram coletadas, pesadas e armazenadas em sacos plásticos previamente identificados e congeladas a $-5^\circ C$. Ao final do experimento, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas e retirada uma subamostra para secagem em estufa ventilada a $55^\circ C$. A seguir, foram moídas e armazenadas em frascos plásticos para análises posteriores.

A urina foi coletada em baldes plásticos contendo 20 mL de ácido clorídrico (HCl) 1:1 para evitar a proliferação bacteriana e possíveis perdas de nitrogênio por volatilização. Do volume total foi retirada alíquota de 5,0%, que foi filtrada e acondicionada em frascos descartáveis, identificadas e armazenadas em freezer (-5°C).

Ao final do experimento foram coletadas fezes para análise microbiológica, sendo coletadas de forma asséptica e acondicionadas em frascos plásticos, e posteriormente transportadas ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Unioeste, onde foram processadas.

O preparo das amostras para as análises microbiológicas foi realizado por meio de uma diluição prévia por meio da coleta de 25 g de amostra. As populações microbianas foram determinadas por meio de técnicas de culturas seletivas: aos 25 g de amostra foi adicionado 225 mL de água destilada estéril. Da solução obtida pipetou-se 1 mL, com diluições que variaram de 10^1 a 10^9 , usando-se tubos de ensaio para água de diluição contendo 9 mL de água destilada estéril.

As populações de bactérias foram determinadas por meio de técnicas de cultura segundo Silva et al. (1997), utilizando os meios de cultura: Reinforced Clostridial Agar para contagem de *Clostridium*, mantendo-se as placas em incubação anaeróbia a 36°C por 24 horas e Standard Methods Agar para contagem bacteriana total, sendo incubado a 35°C por 48 horas.

Após o período de incubação, as colônias foram contadas, utilizando-se um contador de colônias do tipo Quebec, sendo passíveis de serem contadas as placas que apresentaram entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por placa de Petri. Os resultados obtidos na diluição selecionada foram expressos em logaritmo (log), na base dez.

As características avaliadas foram: coeficientes de digestibilidade (CD) da ração para matéria seca (CDMS), proteína bruta (CDPB), matéria orgânica (CDMO) e energia bruta (CDEB); nutrientes digestíveis da ração para proteína bruta (NDPB), matéria seca (NDMS), matéria orgânica (NDMO) e energia digestível da ração (ED); logaritmo da contagem bacteriana total (Log CBT) e logaritmo da contagem de *Clostridium* nas fezes (Log Clos).

O modelo estatístico utilizado para os coeficientes de digestibilidade e energia digestível da ração foi $Y_{ij} = m + t_i + \varepsilon_{ij}$, em que:

Y_{ij} = observação da variável dependente em cada parcela, medida na *i*-ésima fonte de probiótico e na *j*-ésima repetição;

m = efeito da média geral;

t_i = efeito das classes de probiótico, para $i = (1, 2 \text{ e } 3)$;

ε_{ij} = erro aleatório da parcela associado à classe *i* e à repetição *j*;

Antes de avaliar o resultado da análise de variância, foi procedida a análise dos resíduos padronizados de *Student* (*RStudent*), a fim de diagnosticar observações influentes ou *outliers* que pudessem interferir na normalidade dos resíduos. O critério adotado para identificação de *outliers* foi baseado na curva de distribuição normal, ou seja, valores de *RStudent* maiores ou iguais a três desvios-padrão, em valor absoluto, foram considerados como influentes.

A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos para as diversas variáveis foram avaliadas previamente utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk e de Levene (SAS, 2000), respectivamente.

Os efeitos das classes de tratamento sobre as variáveis dependentes foram verificados por meio de análise de variância (ANOVA). As comparações entre médias de tratamento foram efetuadas respeitando-se a significância do teste F da ANOVA por meio do teste t.

O nível de 5% de significância foi adotado em todas as análises estatísticas, que foram feitas utilizando-se o *Statistical Analysis System* (SAS, 2000).

Experimento 2

Para o desempenho foi utilizado 150 leitões, fêmeas e machos inteiros, mestiços, desmamados aos 21 dias de idade e com peso médio inicial de $6,81 \pm 0,71$ kg, foi utilizado em delineamento experimental de blocos casualizados, com arranjo fatorial 3 x 2, constituído de três dietas experimentais e dois sexos, totalizando seis tratamentos e cinco repetições. A unidade experimental foi representada pela baia, onde foram alojados cinco animais, separados por sexo.

Os animais foram alojados em baias suspensas, com piso de polipropileno, dotadas de comedouros semi automáticos e de bebedouros do tipo “chupeta”, em galpão de alvenaria com piso de concreto e telhas de cerâmica.

A temperatura no interior da sala de creche foi mensurada com auxílio de termômetro e controlada por meio de abertura ou fechamento de janelas, e com o uso de lâmpadas incandescentes individuais por baia.

A ração comercial foi fornecida por uma Cooperativa local (Tabela 2). Os níveis de garantia dos nutrientes da ração estão próximos dos limites propostos por Rostagno (2011). Os tratamentos consistiram em: ração comercial isenta de probióticos; ração comercial + probiótico Protexin e ração comercial + probiótico Levucell SB 20. Durante o experimento foram utilizados três tipos de ração, correspondentes a cada fase dos animais, sendo a ração Pré Inicial I (21 a 29 dias de idade), Pré Inicial II (30 a 40 dias de idade) e ração Inicial (41 a 63 dias de idade), fornecidas à vontade.

Tabela 2 - Composição nutricional das rações comerciais e seus respectivos níveis de garantia

Níveis de garantia (%)	Pré-I	Pré-II	Inicial
Umidade (Máx.)	10,0	10,0	12,0
Proteína Bruta (Mín.)	19,0	20,0	20,0
Extrato Etéreo (Mín.)	7,0	6,0	5,0
Matéria Mineral (Máx.)	5,5	5,5	6,0
Lisina (Mín.)	1,45	1,30	1,35
Fibra Bruta (Max.)	3,0	5,0	3,5
Metionina	0,50	0,40	0,48
Cálcio	0,60-0,70	0,55-0,70	0,80-0,90
Fósforo	0,50	0,50	0,60
Sódio	0,33	0,27	0,27

Nível mínimo dos microminerais (mg/kg): Ácido fólico (0,65), Ácido pantotênico (13,72), Cobalto (0,140), Cobre (9500), Ferro (120), Iodo (1,20), Niacina (33,0), Selênio (0,30), Manganês (30,0), Vitamina B1 (1,29), Vitamina B2 (8,32), Vitamina B6 (3,90), Vitamina K3 (1,65), Zinco (2137); Colistina (40,0 ppm).

A ração foi composta de: milho, farelo de soja, farinha de peixe, óleo de soja degomado, plasma sanguíneo, polpa de Chicória seca, soja extrusada, soro de leite em pó, fosfato bicálcico, lisina, metionina, treonina, triptofano e vitaminas A, B1, B2, B6, B12, D3, E e K3. Para a fase inicial a ração não continha ingredientes de origem animal.

A composição dos probióticos e dosagem utilizada foi a mesma do experimento 1.

No decorrer do período experimental o desempenho dos leitões foi avaliado em cada fase dos animais. Assim, os animais foram pesados quatro vezes, à cada troca de ração, ou seja, uma no início do experimento, uma ao final do consumo da ração Pré Inicial I, outra ao final do consumo da ração Pré Inicial II e a última pesagem ao final do experimento, que correspondeu à fase Inicial.

No final de cada fase foi realizada coleta de sangue por meio de punção na veia jugular. Para a coleta foram selecionados três animais por unidade experimental, os quais permaneceram em jejum alimentar por 8 horas. As amostras de sangue foram coletadas, acondicionadas em tubos identificados e após encaminhadas ao Laboratório de Parâmetros Sanguíneos da Unioeste, onde foram centrifugadas a 3000 rpm por um período de 15 minutos para obtenção do soro. Os soros foram retirados com auxílio de pipeta automática e acondicionados em tubos do tipo “ependorf”, identificados e armazenados em freezer a -5°C para análises posteriores, que foram realizadas por meio de analisador químico automático modelo Flexor EL 200, utilizando kits específicos ELI Tech (Clinical Systems).

As características avaliadas foram: peso final (PF), ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e a conversão alimentar (CA) das fases Pré Inicial I, Pré inicial II, Inicial e período total, e níveis sanguíneos de cálcio, fósforo e uréia no final de cada fase.

Para as características de desempenho e o teor de uréia sanguínea, o modelo estatístico utilizado foi $Y_{ijk} = m + P_i + S_j + PS_{ij} + \beta(X_{ijk} - \bar{X}_{...}) + \varepsilon_{ijk}$. Para os níveis sanguíneos de cálcio e fósforo, o modelo estatístico utilizado foi o mencionado, sem a inclusão do efeito da covariável. Os efeitos dos fatores incluídos no modelo são descritos por:

Y_{ijk} = observação média da variável dependente em cada parcela, medida na i-ésima fonte de probiótico, na j-ésima classe de sexo e na k-ésima repetição;

m = efeito da média geral;

P_i = efeito das classes de probiótico, para $i = (1, 2 \text{ e } 3)$;

S_j = efeito das classes de sexo, para $j = (1 \text{ e } 2)$;

PS_{ij} = efeito de interação entre a i-ésima classe de probiótico e a j-ésima classe de sexo;

β = Coeficiente de regressão de Y sobre X;

X_{ijk} = observação média da covariável (peso inicial ou ureia sanguínea inicial) em cada parcela, medida na i-ésima classe de probiótico, na j-ésima classe de sexo e na k-ésima repetição;

$\bar{X}_{...}$ = média geral para a covariável X;

ε_{ijk} = erro aleatório da parcela associado ao nível i, à classe j e à repetição k;

Os efeitos de probiótico, de sexo e de interação entre as classes de probiótico e de sexo sobre as variáveis dependentes foram verificados por meio de análise de variância. Comparações entre médias de quadrados mínimos (*lsmeans*), relacionadas ao efeito de sexo, foram realizadas por meio do teste F. As *lsmeans* de uréia nas fases Pré Inicial II e Inicial da creche foram estimadas considerando-se a correção das médias observadas para a covariável da fase Pré Inicial I (BANZATTO e KRONKA, 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a eliminação de um dado discrepante relacionado a uma repetição do tratamento “Ração + Probiótico A” e uma repetição do tratamento “Ração + Probiótico B”, observou-se que os erros experimentais das características apresentaram distribuição normal de probabilidades e homogeneidade de variâncias dos tratamentos.

Não foi observado efeito ($p>0,05$) de tratamentos sobre as variáveis CDMS, CDPB, CDEB, CDMO, MSD, MOD e ED (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficientes de digestibilidade (CD) e valores de nutrientes digestíveis e energia digestível das rações contendo diferentes tipos de probiótico¹

Característica	S/probiótico	R+Probiótico A	R+Probiótico B	CV (%)
Coeficientes de digestibilidade				
CD MS (%)	92,38	92,29	92,25	1,119
CD PB (%)	91,26	90,99	91,37	1,518
CD EB (%)	92,63	92,41	92,59	1,102
CD MO (%)	93,28	93,16	93,13	0,981
Nutrientes digestíveis e energia digestível				
MS (%)	82,36	82,46	82,41	1,461
PB (%)	17,12 ^b	17,83 ^a	18,11 ^a	1,517
MO (%)	88,25	88,17	88,12	0,974
ED (kcal kg)	4108,2	4098,4	4123,2	1,104

¹Valores seguidos por letras minúsculas diferentes na linha, diferem entre si pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; Ração 1: isenta de probiótico (n=8), ração 2: adição de probiótico Protexin (n=7) ração 3: adição de probiótico Levucell (n=7).

A inclusão de probióticos não alterou ($p>0,05$) os nutrientes digestíveis de matéria seca, matéria orgânica e energia digestível. Resultados semelhantes foram encontrados por Huyanate et al. (2014), utilizando suínos na fase de crescimento com dieta contendo probiótico à base de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Saccharomyces*, que não encontraram valores significativos para os nutrientes digestíveis, energia digestível e metabolizável e coeficientes de digestibilidade nas rações, com exceção da matéria mineral que foi mais absorvida na dieta contendo probiótico.

Houve efeito ($p<0,05$) de tratamento sobre a proteína bruta digestível. Animais que receberam a suplementação de probióticos obtiveram melhor digestibilidade da proteína do que os animais alimentados com ração isenta de probiótico. Vários autores encontraram resultados significativos para o uso de probióticos. Ahmed et al. (2014) utilizaram antibiótico e probióticos como suplemento alimentar em suínos e obtiveram maiores valores de digestibilidade aparente para MS, PB e EE. Meng et al. (2010) e Shim et al. (2010) encontraram melhores resultados de digestibilidade aparente de MS e PB em suínos e frangos de corte suplementados com complexo de probióticos.

Melhores valores para a digestibilidade dos nutrientes por uso de probióticos e antibióticos em rações podem ser atribuídas ao aumento da disponibilidade de nutrientes para absorção por meio da supressão das atividades metabólicas e de crescimento da microbiota intestinal prejudicial, juntamente com a alteração simultânea da morfologia intestinal (SHIM et al., 2010). Bacilos e lactobacilos são conhecidos por aumentar a taxa de transporte da glicose, a altura das vilosidades intestinais e a profundidade de criptas o que contribui para melhorar a absorção de nutrientes em suínos (RAO e WANG, 2010; BREVES et al., 2000).

Tais resultados demonstram que certas espécies de microrganismos presente nos probióticos melhoram a digestão e a absorção de alguns nutrientes devido a secreção de amilase, protease e lipase que favorecem a digestão do alimento (HUAYNATE, 2014; LEEDLE, 2000).

Não houve efeito de fonte de probiótico ($p>0,05$) sobre o logaritmo da contagem de *Clostridium*, no entanto houve efeito de fonte de probiótico ($p<0,05$) sobre o logaritmo da contagem de CBT (Tabela 4). Os animais que foram suplementados com probiótico contendo várias espécies de microrganismos na sua composição (Probiótico A) apresentaram menor contagem em relação aos animais que não foram suplementados.

Tabela 4 - Valores médios de logaritmo (base dez) da contagem bacteriana total (CBT) e da contagem microbiológica para *Clostridium* nas fezes de leitões machos alimentados com diferentes probióticos¹

Fonte de probiótico	Log <i>Clostridium</i>	Log CBT
Ausente na ração	6,64 (7,20x10 ⁶)	7,37 ^a (2,015x10 ⁷)
Probiótico A	6,55 (2,88x10 ⁶)	6,69 ^b (4,950x10 ⁶)
Probiótico B	6,90 (1,25x10 ⁷)	6,91 ^{ab} (1,145x10 ⁷)
CV (%)	9,90	6,76

¹Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; Valores entre parênteses representam a mediana (n=8) da variável original.

Ahmed et al. (2014) realizaram pesquisa avaliando a microbiologia das fezes de leitões semanalmente do 35° ao 58° dia de idade utilizando quatro tratamentos: controle negativo (sem suplementação), controle positivo (adição de antibiótico), probiótico 1 (0,5% de *Lactobacillus*) e probiótico 2 (0,04% de *Bacillus*). Os autores encontraram resultados significativos no 58° dia de idade. Nas contagens de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus* spp. e *Bacillus* spp, os animais que receberam o controle negativo apresentaram piores resultados em relação aos animais que receberam os demais tratamentos. Não houve diferença entre os aditivos, exceto para *Salmonella*, em que os animais que receberam ração com probiótico 1 apresentaram maior contagem em relação aos outros animais alimentados com ração contendo os outros dois aditivos. Isso mostra que determinadas espécies de microrganismos são mais eficientes para redução da concentração de algumas bactérias patogênicas, o que possivelmente pode ter

ocorrido no presente trabalho, em que para *Clostridium* os probióticos não foram eficientes e para CBT apenas o probiótico contendo várias espécies de microrganismos foi eficiente.

Considerando que as rações comerciais contêm antibiótico na sua composição, o efeito significativo observado para a adição do probiótico A mostra que é possível obter melhores resultados trabalhando com antibióticos e probióticos.

Não houve efeito de interação, de sexo e de probiótico ($p>0,05$) sobre as variáveis (PF, GDP, CDR e CA) nas fases Pré inicial I, Pré inicial I e II, e período total (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de médias de quadrados mínimos (*lsmeans*) de peso final, consumo diário de ração, ganho diário de peso em kg e conversão alimentar de leitões, de acordo com as combinações entre classes de probiótico e de sexo, no decorrer do experimento¹

Fase Pré Inicial I (21 a 29 dias de idade)							
Característica	Fêmea			Macho			CV (%)
	Ausência	Protexin	Levucell	Ausência	Protexin	Levucell	
PF	9,30	9,34	9,11	9,19	9,21	9,37	3,84
GDP	0,262	0,265	0,236	0,252	0,250	0,266	14,72
CDR	0,315	0,340	0,319	0,306	0,316	0,327	9,72
CA	1,24	1,32	1,35	1,23	1,27	1,26	11,28
Fases Pré Inicial I e II (21 a 40 dias de idade)							
PF	13,54	13,63	13,30	13,63	13,38	13,93	4,45
GDP	0,332	0,337	0,319	0,334	0,321	0,350	8,65
CDR	0,439	0,443	0,431	0,423	0,422	0,439	8,90
CA	1,33	1,33	1,36	1,26	1,32	1,27	5,56
Período total (21 a 63 dias de idade)							
PF	22,07	21,50	21,90	22,93	22,97	22,81	5,01
GDP	0,409	0,395	0,400	0,427	0,430	0,426	6,60
CDR	0,529	0,534	0,531	0,539	0,553	0,546	6,88
CA	1,35	1,42	1,36	1,29	1,32	1,32	4,31

¹PF: peso final, GDP: ganho diário de peso, CDR: consumo diário de ração, CV: coeficiente de variação.

Observou-se que a covariável peso inicial foi significativa na análise de variância ($p<0,05$) para as características PF, GDP, CDR e CA. Isso demonstra que há a necessidade de corrigir as características de desempenho pelo peso inicial em experimentos com leitões, permitindo aumentar a precisão experimental. Neste contexto, os valores de coeficiente de variação do peso final mantiveram-se baixos, variando de 3,84 a 5,01%, caracterizando uma elevada precisão experimental.

Os valores médios de PF durante o período total de creche variaram de 21,50 a 22,97 kg. Afonso et al. (2013) encontraram valores semelhantes (20,78 a 23,92 kg) em pesquisa feita com leitões na fase de creche. Neste mesmo trabalho os autores avaliaram a inclusão de dois probióticos nas rações e observaram que até os 54 dias de idade dos animais, a combinação dos probióticos *Lactobacillus reuteri*+*Bifidobacterium pseudolongum* e probiótico *Bacillus subtilis*

promoveram maior peso médio nos animais do que os animais que receberam ração sem probiótico, entretanto após esta fase os probióticos não apresentaram diferença.

Os animais apresentaram GDP com valores entre 0,395 e 0,430 kg, CDR de 0,529 e 0,553 kg, e CA de 1,29 a 1,42. Em outros estudos, Papatsiros et al. (2011) avaliaram dietas suplementadas com probióticos para leitões na fase de creche e encontraram valores semelhantes, entretanto o GDP encontrados pelos autores foram menores, variando entre 0,343 a 0,362 kg, e conseqüentemente os valores para CA foram maiores, variando entre 1,50 a 1,56, quando comparados aos encontrados no presente trabalho.

Junqueira et al. (2009), em trabalho avaliando antibióticos, probiótico (*Bacillus toyoi*), prebiótico e simbiótico em leitões de 28 a 42 dias de idade, não encontraram efeito significativo ($p>0,05$) para ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre classes de sexo em nenhuma das variáveis de desempenho analisadas durante as fases Pré Inicial I e Inicial (Tabela 6). Entretanto, na fase Pré Inicial II, houve diferença ($p<0,05$) apenas na conversão alimentar, em que machos apresentaram resultados melhores que fêmeas, com valores médios de 1,28 e 1,34, respectivamente.

Tabela 6 - Comparações entre médias de quadrados mínimos (*lsmeans*) das características de desempenho (kg) nas fases de desenvolvimento, de acordo com o sexo dos suínos¹

Fase Pré Inicial I (21 a 29 dias de idade)				
Sexo	PF	CA	GDP	CDR
Macho	9,26	1,25	0,256	0,316
Fêmea	9,25	1,30	0,254	0,324
CV (%)	3,84	11,28	14,72	9,72
Fases Pré Inicial I e II (21 a 40 dias de idade)				
Macho	13,65	1,28 ^b	0,335	0,428
Fêmea	13,49	1,34 ^a	0,330	0,438
CV (%)	4,45	5,56	8,65	8,90
Período total (21 a 63 dias de idade)				
Macho	22,90 ^a	1,31 ^b	0,427 ^a	0,546
Fêmea	21,82 ^b	1,38 ^a	0,401 ^b	0,532
CV (%)	5,01	4,31	6,60	6,88

¹Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade; PF: peso final, CA: conversão alimentar, GDP: ganho diário de peso, CDR: consumo diário de ração, CV: coeficiente de variação.

Durante o período total, foram verificadas diferenças significativas entre classes de sexo ($p<0,05$) para PF, GDP e CA. Machos apresentaram melhores resultados com relação às fêmeas em todas as variáveis. No período total os machos apresentaram médias de GDP de 0,427 kg, atingindo ao PF com 22,90 kg e alcançando CA de 1,31, enquanto que as fêmeas atingiram

valores de 0,401 kg de GDP, 21,82 kg de PF e 1,38 de CA. Para a variável CDR, não houve diferença estatística significativa.

Guimarães et al. (2011) estudaram a relação macho e fêmea em suínos na fase de crescimento e terminação e encontraram pior conversão alimentar em machos castrados quando comparados com as fêmeas. Os autores concluíram que isso se deve ao fato da ausência de hormônios sexuais nos machos castrados, proporcionando aumento do consumo de ração e redução da capacidade de deposição de proteína nos tecidos musculares.

Melhores índices de desempenho para machos em relação às fêmeas têm sido relatados na literatura, porém, apenas em animais adultos. Entretanto, com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se dizer que a diferença de desempenho entre machos inteiros e fêmeas em suínos são expressadas a partir da fase pré inicial II (de 30 a 40 dias de idade), possivelmente devido à presença da atividade dos hormônios sexuais masculinos.

Não houve efeito de tratamento sobre o cálcio sanguíneo nas fases Pré Inicial I e Inicial (Tabela 7). Os valores encontrados variaram de 9,57 a 10,43 mg/dL. Névoa et al. (2013) encontraram valores próximos (8,53 e 9,06 mg/dL) em tratamentos com leitões utilizando dieta basal (DB), DB + probiótico, DB + antibiótico, DB + probiótico e DB + simbiótico.

Tabela 7 - Valores de médias de quadrados mínimos (*lsmeans*) do cálcio sanguíneo (mg/dL), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de classes de fonte de probiótico e de sexo¹

Fonte de probiótico	Sexo	
	Fêmea	Macho
Fase Pré Inicial I (21 a 29 dias de idade)		
Ausência	10,32	10,36
Protexin	10,39	10,14
Levucell	10,43	10,11
Fase Pré Inicial II (30 a 40 dias de idade)		
Ausência	10,45	10,89 ^a
Protexin	10,54	11,05 ^a
Levucell	10,52	10,20 ^b
Fase Inicial (41 a 63 dias de idade)		
Ausência	9,57	9,99
Protexin	9,57	10,14
Levucell	9,66	10,03

¹Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CV Pré Inicial I: 6,19%, CV Pré Inicial II: 4,74%, CV Inicial: 5,61%.

Na fase Pré Inicial II, machos alimentados com probiótico à base de leveduras apresentaram menor valor ($p < 0,05$) de cálcio sanguíneo comparados aos machos que receberam ração isenta e com probiótico A.

Para o fósforo sanguíneo, não houve efeito ($p>0,05$) de interação entre os tratamentos nas fases Pré Inicial II e Inicial (Tabela 8). Os valores encontrados variaram de 6,21 a 7,78 mg/dL.

Tabela 8 - Valores de médias de quadrados mínimos (*lsmeans*) do fósforo sanguíneo (mg/dL), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de classes de fontes de probiótico e de sexo¹

Fonte de probiótico	Sexo	
	Fêmea	Macho
Fase Pré Inicial I (21 a 29 dias de idade) ²		
Ausência	7,78 ^a	6,21 ^b
Protexin	6,89 ^a	7,04 ^a
Levucell	7,77 ^a	6,52 ^b
Fase Pré Inicial II (30 a 40 dias de idade)		
Ausência	7,19	7,02
Protexin	7,56	7,23
Levucell	6,75	7,13
Fase Inicial (41 a 63 dias de idade)		
Ausência	7,77	7,68
Protexin	7,25	7,62
Levucell	7,23	7,27

⁽¹⁾*lsmeans* seguidas por letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si, pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade; CV Pré Inicial I: 10,28%, CV Pré Inicial II: 9,47%, CV Inicial:15,21%. ⁽²⁾ $p_{(Aus. \times Prot./Fêmea)}=0,0640$; $p_{(Lev. \times Prot./Fêmea)}=0,0668$; $p_{(Prot. \times Aus./Macho)}=0,0806$.

Na fase Pré Inicial I, os machos que receberam ração isenta de probiótico apresentaram menor valor médio ($p<0,05$) do que as fêmeas que receberam a mesma ração, o mesmo ocorreu com animais que receberam a ração contendo probiótico B.

Em experimento utilizando probiótico composto por levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas de leitões na fase de creche, Sant'ana (2012) não encontrou resultados significativos de probióticos no cálcio e fósforo sanguíneo aos 26 dias de idade.

São escassos os trabalhos encontrados na literatura avaliando níveis sanguíneos de cálcio e fósforo em dietas contendo probióticos. Apesar dos resultados encontrados no presente trabalho apresentarem diferença significativa apenas em uma fase de cada variável (fase Pré inicial I para fósforo e fase Pré inicial II para cálcio), não foi encontrado uma explicação plausível para tal fato.

Os valores de ureia sanguínea não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) em nenhuma das combinações entre sexo e probiótico dentro de cada fase (Tabela 9). Os valores apresentaram-se entre 54,0 e 181,0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 9 - Valores de médias ajustadas de quadrados mínimos (*lsmeans*) da raiz quadrada da ureia sanguínea ($\mu\text{g/mL}$), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de classes de fonte de probiótico e de sexo¹

Fonte de probiótico	Sexo	
	Fêmea	Macho
Fase Pré Inicial I (de 21 a 29 dias de idade)		
Ausência	7,81 (63,8)	8,28 (74,0)
Protexin	8,90 (82,0)	8,02 (68,8)
Levucell	9,13 (86,6)	9,92 (100,8)
Fase Pré Inicial II (de 30 a 40 dias de idade)		
Ausência	8,89 (80,4)	7,25 (54,0)
Protexin	10,08 (109,4)	8,69 (78,2)
Levucell	7,99 (70,2)	8,16 (75,0)
Fase Inicial (de 41 a 63 dias de idade)		
Ausência	12,89 (169,0)	12,01 (147,0)
Protexin	12,52 (159,4)	11,48 (134,40)
Levucell	13,51 (181,0)	12,01 (144,4)

¹CV Pré Inicial I: 24,59%, CV Pré Inicial II: 28,83%, CV Inicial: 12,13%; valores entre parênteses: valores originais da característica.

Avaliações de ureia sanguínea tem sido utilizada com grande frequência em experimentos de nutrição animal. Considerando que a ureia é o principal produto do catabolismo de proteínas em mamíferos, o seu teor no sangue pode expressar o estado nutricional do animal, bem como a qualidade e nível proteico das dietas e funcionamento renal.

No presente trabalho notou-se que os animais da fase Inicial apresentaram expressivo aumento na concentração de ureia sanguínea em relação às fases anteriores possivelmente devido à composição da ração nas fases Pré inicial I e II, em que foram utilizados plasma sanguíneo, soro de leite e farinha de peixe como fonte proteica, uma vez que estes ingredientes são conhecidos por apresentarem melhor qualidade e digestibilidade da proteína bruta, gerando menores concentrações de metabólitos.

Avaliando os níveis de ureia, cálcio e fósforo sanguíneos de acordo com as classes de sexo, a raiz quadrada da ureia não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) em nenhuma das fases avaliadas (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de médias de quadrados mínimos (*lsmeans*) do cálcio, fósforo (mg/dL) e da raiz quadrada da ureia sanguínea ($\mu\text{g/mL}$), nas fases Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial, de acordo com as combinações de sexo

Característica	Sexo		CV (%)
	Fêmea	Macho	
Fase Pré Inicial I (21 a 29 dias de idade)			
Ureia (raiz quadrada)	8,61 (77,5)	8,74 (81,2)	24,59
Cálcio	10,38	10,20	6,19
Fosforo	7,48 ^a	6,59 ^b	10,28
Fase Pré Inicial II (30 a 40 dias de idade)			
Ureia (raiz quadrada)	8,98 (86,7)	8,03 (69,1)	28,83
Cálcio	10,50	10,71	4,74
Fosforo	7,16	7,13	9,47
Fase Inicial (41 a 63 dias de idade)			
Ureia (raiz quadrada)	12,97 (169,8)	11,83 (141,9)	12,13
Cálcio	9,60 ^b	10,05 ^a	5,61
Fosforo	7,42	7,52	15,21

Valores entre parênteses correspondem aos valores originais; CV: coeficiente de variação.

Não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) entre classes de sexo sobre o cálcio sanguíneo nas fases Pré Inicial I e II, entretanto na fase Inicial as fêmeas apresentaram menores níveis ($p < 0,05$) que os machos, apresentando valores médios de 9,60 e 10,05 mg/dL, respectivamente.

Para o fósforo sanguíneo não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre classes de sexo nas fases Pré Inicial II e Inicial, entretanto na fase Pré Inicial I os machos apresentaram menor nível de fósforo sanguíneo ($p < 0,05$) que as fêmeas. Os valores médios foram de 6,59 e 7,48, mg/dL respectivamente.

Análises de cálcio e fósforo sanguíneo são bastante utilizadas no meio científico em estudos sobre a produção e nutrição animal, e mostram o comportamento destes minerais no organismo dos animais com relação aos níveis ingeridos pela dieta. Os resultados encontrados na Tabela 10 mostraram que leitões machos inteiros e fêmeas, em determinadas fases, apresentam diferença para algum destes minerais, mostrando uma possibilidade de se trabalhar com dietas diferenciadas de acordo com o sexo.

3.4 CONCLUSÃO

Os probióticos adicionados à ração comercial melhoraram a digestibilidade aparente da proteína bruta.

O probiótico B diminuiu a contagem microbiológica de bactérias totais nas fezes.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferenças de desempenho entre sexo são presentes em animais a partir do 30º dia de idade, motivo pelo qual é importante considerar o sexo em experimentos com leitões.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, E.R.; PARAZZI, L.J.; MARINO, C.T. et al. Associação de probióticos adicionados à dieta de leitões no aleitamento e na creche: índices zootécnicos e economicidade. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 14, p. 161-176, 2013.
- AHMED, S.T.; HOON, J.; MUN, H.S., et al. Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus*-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 96-104, 2014.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4^a ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.
- BREVES, G.; WALTER, C.; BURMESTER, M. et al. In vitro studies on the effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on nutrient transport in pig jejunum. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 84, p. 9-20, 2000.
- BRITO, M.B., PLAZA, J.D., FONTANA, L. et al. In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 23-34, 2013.
- FULLER, R.; COLE, E.C.B. The scientific basis of the probiotic concept. In: STARK, B.A.; WILKINSON, J. M. (Ed.). **Probiotics: theory and applications**. [Marlow]: Chalcombe Publications, p. 1-14, 1989.
- 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 a complex of acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. **Livestock Science**, v. 143, p. 132-141, 2012.
- GUIMARÃES, G.G.1; MURATA, L.S.; MCMANUS, C. et al. Desempenho de suínos de dois cruzamentos de linhagens comerciais criados em cama sobreposta **Archivos de Zootecnia**, v. 60, p. 11-18, 2011.
- HUAYNATE, R.A.R.; THOMAZ, M.C.; SANTANA, A.E. et al. Probiótico em dietas de suínos sobre os parâmetros sanguíneos e digestibilidade de rações **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 1627-1636, 2014.
- 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, p. 2394-2400, 2009.
- KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELLOS, E.J. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 288-96, 2012.
- LAN, Y.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. et al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, p. 95-104, 2005.
- LEEDLE, J. Probiotics and DFMs - mode of action in the gastrointestinal tract. In: Simpósio sobre aditivos alternativos na nutrição animal, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 25-40, 2000.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.
- LOJANICA, M.; MANOJLOVIC, M.; JEREMIC, D. The effects of probiotic *Enterococcus faecium* DSM 7134 in the weaned pigs nutrition. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 26, p. 57-64, 2010.
- MENG Q.W.; YAN, L.; AO, X. et al. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. **Journal Animal Science**, v. 88, p. 3320-3326, 2010.

- NÉVOA, M.L.; CARAMORI, J.G.; CORRÊA, G.S.S. et al. Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 447-454, 2013.
- PEKAS, J. C. Versatile swine laboratory apparatus for physiologic and metabolic studies. **Journal Animal Science**, v. 27, p. 1303-1309, 1968.
- PAPATSIROS, V.G.; TASSIS, P.D.; TZIKA, E.D. et al. Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus Cereus* var. *toyoi* in weaned pig nutrition. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, p. 117-125, 2011.
- POWER, S.E.; O'TOOLE, P.W.; STANTON, C. et al. Intestinal microbiota, diet and health. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 387-402, 2014.
- RAO, J.N.; WANG, J.Y. Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**, v. 3, p. 1-114, 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. Editor Horácio Santiago Rostagno. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, DZO, 2011.
- SAKOMURA, N.K. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos/ Nilva Kazue Sakomura, Horácio Santiago Rostagno. – Jaboticabal: Funep, 2007.
- SANT'ANA, D.S. Adição de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta de leitões desmamados. (Dissertação), 2012.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varala, p. 295, 1997.
- SHIM, Y.H.; SHINDE, P.L.; CHOI J.Y. et al. Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. **Asian-Aust. Journal of Animal Science**, v. 23, p. 521-529, 2010.
- SHON, K.S.; HONG, J.W.; KWON, O.S. et al. Effects of *Lactobacillus reuteri*-based direct-fed microbial supplementation for growing-finishing pigs. **Asian-Aust. Journal of Animal Science**, v. 18, p. 370-374, 2005.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. SAS/STAT User's guide. Version 8.2. 4th ed. v.2. Cary: 2000.
- VILÀ, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I. et al. Reduction of *Salmonella enterica* var. *Enteritidis* colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. **Poultry Science**, v. 88, p. 975-979, 2009.
- WANG, Y.; CHO, J.H.; CHEN, J.S. et al. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. **Livestock Science**, v. 120, p. 35-42, 2009.
- WANG, J.Q.; YIN, F.G.; ZHU, C. Evaluation of probiotic bacteria for their effects on the growth performance and intestinal microbiota of newly-weaned pigs fed fermented high-moisture maize. **Livestock Science**, v. 145, p. 79-86, 2012.