



ASDRUBAL VIANA DOS SANTOS

**EFEITO DO USO DE ADITIVOS NO
DESEMPENHO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DA MICROBIOTA
INTESTINAL DE LEITÕES**

LAVRAS - MG

2011

ASDRUBAL VIANA DOS SANTOS

**EFEITO DO USO DE ADITIVOS NO DESEMPENHO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA INTESTINAL
DE LEITÕES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de concentração em
Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do
título de Doutor.

Orientador
Prof. José Augusto de Freitas Lima

LAVRAS – MG
2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Asdrúbal Viana dos.

Efeito do uso de aditivos no desempenho e caracterização
molecular da microbiota intestinal de leitões

/ Asdrúbal Viana dos Santos. – Lavras : UFLA, 2011.

103 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: José Augusto de Freitas Lima.

Bibliografia.

1. Prebióticos. 2. Probióticos. 3. Antibióticos. 4. Parâmetros
sanguíneos. 5. Suínos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.408557

ASDRUBAL VIANA DOS SANTOS

**EFEITO DO USO DE ADITIVOS NO DESEMPENHO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA INTESTINAL
DE LEITÕES**

Tese apresentado à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de concentração em
Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do
título de Doutor.

APROVADA em 6 de junho de 2011.

Prof. Elias Tadeu Fialho	DZO/UFLA (Presidente)
Prof. Márcio Gilberto Zangerônimo	DMV/UFLA
Prof. Vinícius de Souza Cantarelli	DZO/UFLA
Profª. Ana Paula Peconick	DZO/UFLA
Prof. Raimundo Vicente de Souza	DMV/UFLA
DSc. Marcus Leonardo Figueiredo Silva	GUABI NUTRIÇÃO ANIMAL

Prof. José Augusto de Freitas Lima
Orientador

LAVRAS - MG
2011

Ofereço

Aos meus pais, Lindolfo e Jacy, e aos meus irmãos, Ronilton, Sirlande, Josemar, Sirleide, Júlio César e Simone, por todo amor a mim dedicado, enorme incentivo e apoio incondicional nos momentos mais importantes e decisivos da minha vida. Diante de tudo que fizeram por mim ao longo destes anos, serei eternamente grato.

Aos meus filhos, que são a minha fonte de inspiração, por sua alegria contagiante e inúmeros momentos de felicidade compartilhados.

Aos meus GRANDES AMIGOS E IRMÃOS, Alcino Martins Pereira Martins Júnior, Leandro Alvarenga, José Libêncio Babilônia, Ulisses Nascimento, Silvio, Doralice e Gilcéia. Vocês foram a minha família em Lavras.

Vocês serão sempre lembrados com muito carinho no meu coração.

Dedico

A todas as pessoas que não tiveram a oportunidade de se sentarem em um banco de escola, mas que contribuíram de forma indireta para a realização deste sonho.

Vou passar pela vida uma só vez, por isso, qualquer coisa boa que eu possa fazer, ou alguma amabilidade que possa fazer a um ser humano, devo fazê-lo agora, porque não passarei de novo por aqui.

Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

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

Ao Instituto Federal Tecnológico do Espírito Santo, pela oportunidade.

À Uniquímica, pelo apoio ao fornecer o aditivo probiótico.

Aos amigos e professores José Augusto de Freitas Lima, Elias Tadeu Fialho, Márcio Gilberto Zangerônimo, Vinicius de Sousa Cantarelli, Raimundo Vicente de Souza, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, Paulo Borges Rodrigues, Antônio Gilberto Bertechini, Ana Paula Peconick e Marcus Leonardo Figueiredo Silva, pela amizade, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos meus amigos e colegas de doutorado que foram fundamentais durante este período, Nilson Nunes Morais Júnior, Sandra Cecília Nunes Morais, Nair Elizabeth, Guilherme, Jéferson, Fábio Augusto e Tiago Teófilo.

Ao amigo Anderson Tadeu da Silva, pelo apoio e compreensão na execução nas análises laboratoriais

À Maria Gabriela, Cíntia Lacerda e Patrícia, pelo apoio e compreensão na execução nas análises laboratoriais.

À funcionária Eliana Maria dos Santos, do DZO, pela amizade e apoio.

Aos funcionários Carlos Henrique de Souza, Keila Cristina Oliveira, José Virgílio, Hélio Rodrigues e Marcio dos Santos Nogueira, pela amizade e dedicação durante minha passagem pela UFLA

A DEUS, por permitir todas estas oportunidades na minha vida e pela sabedoria para não perdê-las, e que faça de mim, a cada dia, um ser humano melhor.

RESUMO

Como forma de verificar a eficácia dos prebióticos, probióticos e antibióticos foram utilizados para avaliar a composição da microbiota intestinal de leitões na fase de creche, o desempenho, parâmetros imunológicos e diarreia. Foram utilizados 80 leitões com idade de 22 dias, sendo 40 machos e 40 fêmeas, com peso inicial de $7,1 \pm 0,075$ kg. O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo: 1- Controle; 2- Prebiótico (mananoligossacarídeo); Probiótico (*Bacillus subtilis* 30g/tonelada) e antibiótico (Bacitracina de zinco 125g/tonelada). Foi abatido um animal por parcela aos 29, 36 e 54 dias de idade. As variáveis avaliadas foram ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA), consistência fecal, leucócitos totais (linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos); Utilizando a técnica de ELISA e método indireto dosou-se imunoglobulinas A (IgA), G (IgG) e M(IgM); para a caracterização da microbiota intestinal utilizou-se a Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) e a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) no sequenciamento dos micro-organismos nas regiões ileal e cecal. Aos 34 dias de idade os animais não apresentaram diferenças para ganho de peso ($P>0,05$), porém, maior consumo de ração ($P<0,05$), na dieta contendo prebiótico na ração; a conversão alimentar foi melhor ($P<0,05$) para a dieta controle. No período de 54 dias de idade dos animais, não houve efeito para ganho de peso diário ($P>0,05$), consumo de ração diário ($P>0,05$) e conversão alimentar ($P>0,05$); Não houve efeito para consistência fecal ($P>0,05$). O prebiótico e o probiótico influenciaram no aumento de leucócitos aos 54 dias de vida dos animais, eosinófilos foram maiores ($P<0,05$) para prebióticos aos 36 dias de idade; Não houve alteração nas imunoglobulinas IgA, IgG e IgM ($P>0,05$); Os micro-organismos existentes, para duas regiões intestinais avaliadas; no íleo foram: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Prevotella* sp., c) *Selenomonas noxia*, d) *Mycobacterium vanbaalenii*, e) *Uncultured bacterium*, f) *Ostreococcus lucimarinus*, g) *Escherichia coli*, h) *Agrobacterium tumefaciens*, i) *Uncultured bacterium*, j) *Bacteroidetes bacterium*, k) *Methanobrevibacter ruminantium*, l) *Geobacter bemidjensis*, no ceco foram identificadas: a) *Burkholderia xenovorans*, b) *Pseudomonas fluorescens*, c) *Lactobacillus rhamnosus*, d) *Streptococcus suis*, e) *Stenotrophomonas maltophilia*, f) *Eubacterium minutum*, g) *Enterobacter hormaechei*, h) *Clostridium* sp. e i) *Uncultured bacterium*. As bactérias identificadas apresentaram-se distintas de acordo com a região intestinal pesquisada. Nas condições experimentais, os aditivos não influenciaram o desempenho. Prebióticos e probióticos aumentam o número de leucócitos e eosinófilos, porém, não influenciam a produção de imunoglobulinas. Os aditivos não influenciaram na floram intestinal.

Palavras-chave: Prebióticos. Probióticos. Antibióticos. Parâmetros sanguíneos.
Suínos

ABSTRACT

As a way to verify the effectiveness of prebiotics, probiotics and antibiotics; performance, immunological parameters and diarrhea were used to evaluate the composition of the intestinal microbiota of piglets in the post-weaning phase. 80 pigs aged 22 days, that is, 40 males and 40 females, with an initial weight of 7.1 ± 0.075 kg were used. The design utilized was randomized blocks with four treatments and five replicates, that is: 1 - Control 2 - prebiotic (MOS) Probiotic (*Bacillus subtilis* 30g/ton) and antibiotic (Bacitracin Zinc 125g/ton). One animal per plot was slaughtered at 29, 36 and 54 days old. The variables evaluated were daily average gain (ADG), daily feed intake (DFI), feed conversion (FC), fecal consistency, total leukocytes (lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils). By using ELISA and the indirect method, immunoglobulin A (IgA), G (IgG) and M (IgM) were dosed; for the characterization of the intestinal microbiota, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Gel Electrophoresis Denaturing Gradient (DGGE) were used in the sequencing of micro organisms in the ileal and cecal regions. At 34 days of age, the animals showed no differences in weight gain ($P > 0.05$), however, higher feed intake ($P < 0.05$) in the diet containing prebiotics; feed conversion was better ($P < 0.05$) for the control diet. In the period of 54 days of age of the animals, no effect on daily weight gain ($P > 0.05$), daily feed intake ($P > 0.05$) and feed conversion ($P > 0.05$) and no effect on fecal consistency ($P > 0.05$) too. Both the probiotic and prebiotic influenced the increase of leukocytes at 54 days of life of the animals, eosinophils were higher ($P < 0.05$) for prebiotics at 36 days of age; there were no changes in the immunoglobulins IgA, IgG and IgM ($P > 0.05$) The existing micro-organisms for two evaluated intestinal regions; in the ileum were: *a-Pseudomonas aeruginosa* *b-Prevotella* sp. *c-Selenomonas noxia*, *d-Mycobacterium vanbaalenii*, *e- uncultured bacterium*, *f-Ostreococcus lucimarinus*, *g-Escherichia coli*, *h-Agrobacterium tumefaciens*, *i-uncultured bacterium*; *j-Bacteroidetes bacterium* *k - Methanobrevibacter ruminantium*; *l-Geobacter bemidjiensis*, in the cecum were identified: *a-xenovorans Burkholderia*, *b-Pseudomonas fluorescens*, *c, Lactobacillus rhamnosus*, *d-Streptococcus suis*, *e-Stenotrophomonas maltophilia*; *f-Eubacterium minutum*, *g-Enterobacter hormaeche*, *h-Clostridium* s., *i-uncultured bacterium*. The identified bacteria presented themselves distinct according to the intestinal region studied. Under the experimental conditions, the additives did not affect performance. Both prebiotics and probiotics increase the number of leukocytes and eosinophils, but, they did not influence immunoglobulin production, additives did not affect the intestinal flora.

Keywords: Prebiotics. Probiotics. Antibiotics, Blood parameters, Swine.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO	2	
Tabela 1	Composição das dietas experimentais.....	46
Tabela 2	Desempenho de leitões dos 22 aos 43 dias de idade recebendo prebiótico, probiótico e antibiótico nas rações.....	49
Tabela 3	Desempenho de leitões dos 22 aos 54 dias de idade, recebendo prebiótico, probiótico e antibiótico.....	50
Tabela 4	Consistência fecal de leitões na fase de creche no período de 22 a 54 dias de idade.....	52
Tabela 5	Leucócitos totais, (células/mm ³) aos 7, 14 e 32 dias de experimento, com leitões recebendo prebiótico, probiótico e antibiótico	54
Tabela 6	Valores de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM de leitões na fase de creche nos períodos de 7, 14 e 32 dias de experimento.....	58
CAPÍTULO	3	
Tabela 1	Composição das dietas experimentais.....	77
Tabela 2	Micro-organismos da região ileal e cecal de suínos na fase de creche.....	81

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Microbiota intestinal de suínos.....	15
2.2	O sistema imune de suínos.....	16
2.3	Antibióticos como promotores de crescimento.....	21
2.4	Prebióticos.....	23
2.5	Interação entre mananoligossacarídeos, bactérias patogênicas e imunidade.....	24
2.6	Probióticos.....	28
2.7	Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Gradiente de Desnaturação (DGGE).....	30
	REFERÊNCIAS.....	33
	CAPÍTULO 2 Probióticos e prebióticos como aditivos alternativos ao uso de antibióticos para leitões na fase de pós-desmama.....	39
	RESUMO.....	40
	ABSTRACT.....	41
1	INTRODUÇÃO.....	42
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1	Local, instalações e animais.....	44
2.2	Delineamento experimental.....	45
2.3	Dietas experimentais.....	45
2.4	Coleta de amostras e análises laboratoriais.....	47
2.5	Análise estatística	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.1	Consistência fecal.....	52
3.2	Leucometria global e imunoglobulinas.....	53

4	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	CAPÍTULO 3 Composição da microbiota intestinal de leitões de 6 a 25 kg.....	68
	RESUMO.....	69
	ABSTRACT.....	70
1	INTRODUÇÃO.....	71
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1	Local, instalações e animais.....	73
2.2	Delineamento experimental.....	74
2.3	Dietas experimentais.....	74
2.4	Procedimentos experimentais.....	76
2.4.1	Mensurações microbiológicas.....	76
2.4.2	Sequenciamento.....	78
2.4.3	Dendograma de similaridade.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXOS.....	94

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem grande potencial como produtor e exportador na cadeia suinícola mundial, devido à sua vasta extensão territorial, solo, clima favorável, produção de grãos, bem como sua grande capacidade técnica, com preços bastante competitivos em relação a outros mercados produtores e exportadores.

Na produção intensiva de suínos, o desmame dos leitões é o período de maiores perdas para os produtores. Durante o desmame, maior atenção aos leitões, em termos de manejo, nutrição, ambiente e sanidade, são fundamentais para o bom desempenho desses animais.

Para amenizar as perdas no desempenho dos animais durante esta fase, tem sido proposto o uso de antibióticos. Grandes restrições têm sido impostas à importação de carne suína por parte de países desenvolvidos, principalmente da Europa, devido ao surgimento de microrganismos resistentes ao uso dos antibióticos e possíveis efeitos residuais na carne. Para contornar tal situação, várias pesquisas propõem oferecer outros aditivos alternativos aos antibióticos.

Atualmente, se conhece cerca de 10% da população microbiana presente no trato gastrointestinal dos suínos, sendo principalmente aqueles cultiváveis. Técnicas modernas como reação em cadeia da polimerase (PCR) e *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), podem identificar a composição dessa microbiota, que tem papel importante nos processos digestivos e nutricionais desses animais.

Conhecendo-se os possíveis mecanismos de atuação da microbiota com o hospedeiro, bem como seus mecanismos de ativação do sistema imune do animal, torna-se possível propor alternativas que promovam aumentos da microbiota benéfica e desfavoreçam a enteropatogênica.

Logo após o desmame, mudança de ambiente, alteração brusca na alimentação, densidade de criação e formação de novos grupos sociais são fatores determinantes no desempenho de suínos. Nesse período, o aparelho digestivo, bem como os fatores que envolvem a digestão, como, por exemplo, a atividade enzimática nos leitões, sofre várias mudanças com o decorrer da idade e, principalmente, durante as cinco primeiras semanas de vida. Estas são decorrentes, principalmente, de alterações nas capacidades de secreções hormonais e enzimáticas de glândulas e órgãos, assim como do aumento na disponibilidade de ácido no estômago. Em função disso, o consumo de ração nos primeiros dias é prejudicado, resultando em menor ganho de peso, bem como o desenvolvimento de bactérias no trato gastrointestinal dos leitões, provocando diarreias e contribuindo para aumentar a mortalidade desses animais.

Uma das práticas comerciais comuns tem sido a recomendação do uso de diferentes aditivos como forma de ajudar o leitão neste estágio, tais como mananoligossacarídeos, frutoligossacarídeos, probióticos, ácidos orgânicos, simbióticos, zinco, cobre e extratos de microrganismos ou plantas na ração fornecida aos animais.

Assim, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o uso de prebióticos e probióticos em substituição aos antibióticos sobre a composição da microbiota intestinal de leitões na fase de creche, bem como os parâmetros de desempenho, imunológicos e incidência de diarreia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbiota intestinal de suínos

Segundo Tannock (1998), o trato gastrintestinal dos suínos abriga uma microbiota vasta e metabolicamente ativa, primariamente constituída por bactérias. Essa microbiota é composta por várias espécies bacterianas, formando um ecossistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro.

No trato gastrointestinal existe um ecossistema dinâmico contendo uma complexa comunidade de microrganismos microaerófilos e anaeróbicos que estão envolvidos na fermentação do alimento ingerido e de componentes secretados pelo hospedeiro. Efeitos e atividades metabólicas dessa microbiota no sistema intestinal necessitam de atenção especial; no sistema de produção de suínos, o crescimento do animal é o principal (COLLIER et al., 2003). O conhecimento da composição e da função das comunidades microbianas e da atividade de determinadas espécies dentro deste ecossistema é necessário para o desenvolvimento de alternativas racionais aos antibióticos nas dietas (KONSTANTINOV et al., 2004).

De acordo com Leahy et al. (2005), a microbiota tem como função metabólica principal a fermentação de resíduos não digeridos da dieta e do muco endógeno produzido pelo epitélio. O metabolismo bacteriano está também envolvido no aproveitamento de energia na forma de ácidos graxos de cadeia curta e absorção de íons. Dessa forma, são liberados para os hospedeiros substratos de fácil absorção, enquanto a microbiota presente obtém energia e outros nutrientes para a sua multiplicação.

Além da possibilidade de favorecer o desempenho, a microbiota atua como um modulador vital do sistema imune, em que receptores “tool-like” (TLR) foram recentemente reconhecidos como importantes instrumentos de sinalização para o reconhecimento da microbiota (LEAHY et al., 2005). A invasão por patógenos é muito dependente de um conjunto de fatores que afetam o animal, incluindo a composição e a atividade da microbiota intestinal (KONSTANTINOV et al., 2004). Ainda segundo os mesmos autores, no passado, a microbiota intestinal de suínos foi intensamente estudada utilizando-se as técnicas tradicionais de cultura, demonstrando que a maioria da microbiota colônica e fecal era de anaeróbios estritos gram-positivos pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus*.

Os microrganismos gram-negativos, principalmente os pertencentes aos grupos *Bacteroides* e *Prevotella*, perfazem cerca de 10% do total de bactérias cultiváveis. Porém, muitas das bactérias anaeróbias, de difícil cultivo, permaneciam indetectadas pelas técnicas tradicionais de cultura (KONSTANTINOV et al., 2004).

2.2 O sistema imune dos suínos

As respostas imunológicas podem ser divididas em mecanismos inatos e adaptativos de defesa. Células do sistema imune inato promovem o reconhecimento de padrões ou *pattern recognition receptors* (PRRs) e detectam estruturas moleculares invariáveis, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos, ou *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), cujas partes apresentam estruturas conservadas de patógenos (JANEWAY et al., 2007). Recentes estudos apontam que os adipócitos e as fibras musculares são equipados com os PRRs e são capazes de responder diretamente a patógenos e a

outros ligantes específicos ao receptor. Dessa forma, tais células atuam ativamente na resposta imune inata e, como tal, induzem a produção de um elevado número de substâncias reguladoras do sistema imune e do metabolismo, incluindo citocinas pró-inflamatórias e adiponectina (GABLER; SPURLOCK, 2008).

De acordo com Tizard (1998), uma das mais importantes propriedades do sistema imune é a capacidade de reconhecer e diferenciar o estímulo a que é submetido, impedindo, dessa forma, a elaboração de processos reativos contra componentes do próprio organismo ao qual pertence.

O sistema imune é representado por uma grande variedade de moléculas, mediadores metabólicos e células que estão envolvidas na resposta imune. A população leucocitária mais amplamente envolvida nos processos da imunidade adaptativa é representada pelos linfócitos. A medula óssea e o timo representam os órgãos linfóides primários, em que a produção de linfócitos B e T ocorre na medula óssea e a maturação de linfócitos T no timo. Já nos órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos, baço e tecidos linfóides associados às mucosas), ocorre, prioritariamente, a ativação das células linfóides pelos antígenos (ARIAS; SÁNCHEZ-VISCAÍNO, 1999 citados por MACHADO; FONTES, 2005).

Alterações na composição e na concentração sérica de certas proteínas são observadas envolvendo processos inflamatórios, infecções e danos teciduais (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Nos animais domésticos, sabe-se que a resposta de fase aguda é uma reação não específica do organismo aos distúrbios na homeostasia, devido a infecções, processos inflamatórios, lesões teciduais, crescimentos neoplásicos e desordens imunológicas (SHELDON et al., 2001).

Estudos apontam que avaliar concentrações séricas das proteínas de fase aguda em suínos pode fornecer não apenas informação útil para diagnóstico

veterinário na saúde dos animais (ITOH et al., 1992), mas também fornecer parâmetros para melhorar a saúde do rebanho (BURGER, 1992).

Estudos das proteínas de fase aguda se tornaram muito utilizados no auxílio à detecção de uma ativação imunológica, porém, outras análises podem ser realizadas para auxiliar também na detecção e no estado sanitário dos suínos, como é o caso do leucograma. Os leucócitos dos mamíferos são células responsáveis pela defesa do organismo e estes incluem neutrófilos segmentados, monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Todos contribuem para a defesa do organismo, mas cada qual atua de forma independente, cinética e funcionalmente (LATIMER; MAHAFFEY; PRASSE, 2003). Os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (monócitos) são produzidos na medula óssea por um mecanismo de proliferação e de maturação celular (JAIN, 1993). Quando são alteradas as condições de estresse imunológico para o cenário da produção animal, há evidências científicas suficientes para concluir que a ativação do sistema imune pode resultar em prejuízo efetivo a diversas respostas zootécnicas estudadas (SAUBER; STAHLY; NONNECKE, 1999).

Neutrófilos são granulócitos que formam a primeira linha de defesa celular contra infecções microbianas. São produzidos na medula óssea e distribuídos no sangue na forma madura (neutrófilo segmentado). O neutrófilo bastonete é uma forma imatura, estando presente na circulação em pequeno número (JAIN, 1993). Eles constituem a primeira linha de defesa do organismo em razão de três funções básicas desenvolvidas por essas células: aderência, quimiotaxia e fagocitose (LOPES et al., 1996).

Os monócitos são células que estão envolvidas na fagocitose e na morte de bactérias, vírus, fungos e protozoários (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Os monócitos originam-se da medula óssea, circulam por curto período e transformam-se em macrófagos nos tecidos (DUNCAN; PRASSE, 1982).

Tanto a produção como a liberação de eosinófilos são reguladas por linfocinas produzidas por linfócitos T-fator estimulador de colônia eosinofílica (Eos-CSF), eosinofilopoietina e um fator de liberação de eosinófilos (JAIN, 1993). Tanto em processos parasitários ou alérgicos há interação de linfócitos, mastócitos, basófilos e eosinófilos. Os linfócitos T e os mastócitos produzem eosinofilopoietina que atua na medula óssea, elevando a formação de eosinófilos (WILLARD; TVEDTEN; TURNWALD, 1994). Mesmo que os eosinófilos possam permanecer até duas semanas nos tecidos sob a influência das citocinas, permanecem apenas algumas horas no sangue (LILLIEHÖÖK; TVEDTEN, 2003).

O eosinófilo destrói o parasita, atacando-o e formando um vacúolo digestivo entre ele e o parasita (WILLARD; TVEDTEN; TURNWALD, 1994). A eosinofilia, em geral, se desenvolve em resposta a estímulos específicos, incluindo doenças parasitárias, alergias ou outras reações de hipersensibilidade e vários agressores tissulares. Os eosinófilos colaboram na defesa do hospedeiro porque participam da morte de alguns parasitos, aumentando as respostas inflamatórias pela ativação de mediadores químicos e participam das respostas antitumorais (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Os processos alérgicos devem ser considerados na interpretação da eosinofilia (BARGER, 2003). Em algumas áreas, os animais podem apresentar eosinofilia em certas épocas do ano, devido a alérgenos no ambiente e à carga de parasitas (MEINKOTH; CLINKENBEARD, 2000).

Os basófilos possuem proteoglicanos, a histamina, que possivelmente exerce um papel nas reações imunomediadas, principalmente na anafilaxia e na indução das reações de hipersensibilidade imediata ou respostas de hipersensibilidade a parasitos ou alérgenos (ETTINGER; FELDMAN, 2004). O aumento no número de basófilos pode ocorrer pelas mesmas causas da eosinofilia ou associada à lipemia. Geralmente, a eosinofilia acompanha a

basofilia como parte do processo mediado por IgE, eosinófilo e basófilo/mastócito (WILLARD; TVEDTEN; TURNWALD, 1994). A formação de basófilos ocorre na resposta imune inata e é regulada por IL-3 e por uma linfocina basofílica específica (basofilopoietina) produzida por linfócitos T (JAIN, 1993).

As células com características morfológicas de linfócitos apresentam ampla variedade de funções no sistema imunitário (ETTINGER; FELDMAN, 2004). De acordo com o mecanismo de ação no processo imunológico, os linfócitos são classificados de linfócito T (imunidade celular) e linfócito B (imunidade humoral). A diferenciação entre os tipos de linfócitos pode ser feita por diferentes técnicas entre as quais estão a imunogenética, a microscopia eletrônica e a citoquímica (LOPES et al., 1996).

Pie et al. (2004) avaliaram os efeitos pós-desmame em leitões e demonstraram que existe uma associação desta prática com um rápido aumento das citocinas pró-inflamatórias no intestino nos primeiros dois dias após o desmame, o que pode colaborar para distúrbios do trato gastrintestinal. De acordo com o mesmo autor, o sistema imune em resposta ao estresse e à exposição aos antígenos estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo a motivação para o consumo e interagindo com o hormônio do crescimento e com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) reduzindo, dessa forma, o crescimento celular, assim gerando prejuízos ao desempenho animal.

2.3 Antibióticos como promotores do crescimento

Os antibióticos são compostos sintetizados por organismos vivos que inibem o crescimento de outros e sua utilização em níveis subterapêuticos em rações de animais tem ocorrido desde a década de 1940. Estes aditivos melhoram a produtividade animal (ganho de peso e conversão alimentar), principalmente nas fases iniciais de criação (SILVA, 2000). Ainda segundo o mesmo autor, os antibióticos atuam também reduzindo infecções bacterianas intestinais, preservando a integridade da mucosa intestinal, permitindo que haja melhor absorção de nutrientes e resultando em melhor produtividade animal. Há normas que regulam o período de retirada dos promotores de crescimento das rações para que os animais possam eliminar todo e qualquer resíduo dos tecidos e produtos comestíveis. Vários princípios ativos dos antibióticos são também utilizados na terapêutica veterinária e humana. Outros apresentam estrutura química que induzem resistência cruzada a antibióticos utilizados em humanos e animais (SILVA, 2000).

Menten (2001) citou em revisão que o uso frequente de antibióticos na alimentação animal passou a ser visto como fator de risco para a saúde humana e a continuidade de sua aplicação sofreu contestações em duas frentes: a) a possível presença de resíduos de antibióticos na carne, ovos ou leite, que entram na alimentação humana e esses resíduos podem ser os próprios aditivos ou seus metabólitos que podem se acumular nos produtos comestíveis e os riscos potenciais incluem desde reações de hipersensibilidade até propriedades cancerígenas e b) indução de resistência cruzada para bactérias patogênicas para humanos. Assim, a utilização prolongada de certos antibióticos pode permitir uma seleção de estirpes resistentes dentro de grupos de bactérias que são patogênicas primárias ou oportunistas para humanos. Assim, em junho de 1999, a Comunidade Econômica Européia (CEE) banuiu o uso de alguns antibióticos

promotores do crescimento na alimentação de aves e suínos em função do aparecimento de resistência a várias drogas utilizadas em terapia na medicina humana.

A resistência bacteriana se dá quando esses microrganismos desenvolvem mecanismos de sobrevivência ao uso do promotor de crescimento, sendo este fato, de forma generalizada, associado ao uso de doses subterapêuticas de forma continuada por longos períodos. Edens (2003) descreve essa resistência como sendo: decorrente do aumento da resistência à absorção do antibiótico pela parede celular, anulando parcialmente ou totalmente o seu efeito; aumento do metabolismo do antibiótico com sua transformação em produto não lesivo às bactérias e transformação em metabólitos alternativos que permitem aos microrganismos uma coexistência com a droga.

A resistência microbiana é passada de uma bactéria a outra por três principais mecanismos: transformação, quando a bactéria se torna apta a utilizar o DNA do meio no qual se encontra; transdução, ocorre quando é transferido material genético de uma bactéria a outra por um vírus; conjugação, ocorre quando uma bactéria doadora, através de uma fimbria, transfere porções extracromossômicas de DNA para uma outra bactéria receptora. O DNA é incorporado no citoplasma da bactéria receptora na forma de um plasmídio que é capaz de replicar mecanismos de resistência, independente do cromossomo do hospedeiro. Esse mecanismo é denominado de resistência múltipla e infecciosa, podendo ocorrer em diferentes bactérias.

O uso de antibióticos como promotores do crescimento como moduladores de microrganismos no trato gastrointestinal ocorreu, inicialmente, em doses baixas, apresentando resultados significantes sobre os parâmetros produtivos e, posteriormente, com o uso continuado, houve a necessidade de doses crescentes até exaurir-se a droga com efeitos pouco significativos. Dessa forma, surgiram os microrganismos resistentes a diferentes tipos de drogas

utilizadas com a intenção de promover o crescimento e a produção dos animais (LANCINI, 1994). Demandas crescentes na indústria suinícola, principalmente na fase de creche e crescimento, agravaram esse quadro, pois os antibióticos foram utilizados em doses subterapêuticas e, na maioria das vezes, indiscriminadamente, não obedecendo a critérios mínimos de segurança.

2.4 Prebióticos

Prebióticos são ingredientes nutricionais não digeríveis da dieta que afetam benéficamente o organismo animal, que estimula seletivamente ou ativamente o crescimento e o metabolismo de uma ou mais bactérias benéficas no trato gastrointestinal, melhorando a saúde intestinal do animal (MILTENBURG, 2000).

Bifidobactérias são bactérias únicas com capacidade de usar carboidratos como fontes de energia e carbono por possuírem uma ordem pouco comum de enzimas glucosídicas, que não são encontradas na maioria das bactérias presentes no intestino animal. Os mecanismos pelo qual surge essa interação ainda não estão totalmente esclarecidos, porém, o fato de se fornecer carboidratos de fermentação seletiva para uma população microbiana benéfica favorece efeitos diretos e indiretos na atividade metabólica do ecossistema microbiano, entre eles a inibição da putrefação e organismos patogênicos, resistência à colonização, menor pH intestinal, maior solubilidade de minerais e melhor absorção.

As mananas têm sido empregadas como uma das possibilidades na prevenção de doenças causadas por patógenos, evitando, assim, a adesão dos mesmos às células epiteliais intestinais. As mananas derivadas da porção externa da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm surtido efeito desses componentes em evitar a adesão de bactérias no organismo do

hospedeiro. Assim, receptores ricos em manose ocupam os sítios de ligação nas bactérias, impedindo a colonização de bactérias patogênicas no animal (MORAN; VEIGA, 2009).

2.5 Interação entre mananoligossacarídeos, bactérias patogênicas e imunidade

Um sistema digestivo saudável é fundamental para o bom desempenho animal. Uma grande área superficial, associada a uma alta carga microbiana, possibilita ao intestino alta vulnerabilidade à entrada de patógenos. O trato gastrointestinal tem um eficiente mecanismo de vigilância para a verificação de patógenos. Entre os vilos encontram-se áreas conhecidas como Placas de Peyer, em cujo interior localizam-se células especiais como Microfold ou células M. As células M estão constantemente coletando amostras do conteúdo líquido intestinal à procura de partículas estranhas e preparam as defesas imunológicas para qualquer problema potencial (MORAN; VEIGA, 2009).

De acordo com Spring e Privulescu (1998), mananas aumentam a produção de imunoglobulinas (IgA) em diferentes condições de produção e em várias espécies animais. Esse aumento no aporte de imunoglobulinas confere maior proteção a infecções, antes que se tornem mais graves.

Segundo Spring (2000), os oligossacarídeos são capazes de reduzir a prevalência de cepas, impedindo a colonização do trato gastrointestinal por patógenos. Além disso, modulam respostas imunológicas e diminuem a estimulação antigênica do trato gastrointestinal por meio da alteração do microambiente intestinal e adsorção de toxina. Açúcares tipo mananoligossacarídeos na dieta podem bloquear a adesão bacteriana por meio da aderência a proteínas específicas da superfície da célula bacteriana e, portanto, reduzindo a colonização intestinal por patógenos.

Os mananoligossacarídeos influenciam a ecologia microbiana, dificultando a adesão bacteriana e diminuindo a concentração de patógenos. Podem também neutralizar micotoxinas e manter a integridade da mucosa intestinal. Por serem derivados de parede celular de leveduras e consistir principalmente de glicomananas fosforiladas, são reconhecidos os seguintes modos de ação, de acordo com Pettigrew (2000); 1) ligam-se às lectinas nas paredes de certas bactérias indesejáveis. Essas lectinas bacterianas ligam-se às células epiteliais intestinais e auxiliam as bactérias na colonização. Entretanto, se estiverem ligados ao mananoligossacarídeo, elas não poderão ligar-se às células epiteliais, Dessa forma, as bactérias indesejáveis serão eliminadas do lúmen intestinal e 2) aumentam certas ações do sistema imune, estimulando a produção de imunoglobulinas A (IgA).

A suplementação com *Saccharomyces* tem apresentado melhoras no desempenho e na modulação da taxa de proliferação de células epiteliais e no número de macrófagos no íleo (BONTEMPO et al., 2006).

Ganner et al. (2009) avaliaram o efeito de frações de parede celular de leveduras sob a resposta imunológica (IgG, IgM, IgA), linfócitos e monócitos de leitões em desmama, concluindo que frações de parede celular são capazes de modular a imunidade inata e adaptativa, porém, sem afetar monócitos nos dois grupos estudados, bem como para o desempenho dos animais. Valores elevados de monócitos podem intensificar as defesas do hospedeiro e prevenir contra doenças.

A ativação de macrófagos é mais eficiente na apresentação de antígenos às células produtoras de anticorpos, resultando numa maior capacidade de fagocitar bactérias e destruir organismos invasores. Dessa forma, o MOS é capaz de aumentar os níveis de anticorpos circulantes específicos em resposta à exposição a antígenos (SPRING, 2000).

Spring e Privulescu (1998) verificaram o efeito de mananoligossacarídeo sobre o sistema imune de aves e observaram aumento de cerca de 25% de níveis de IgA secretória. Ainda foi evidenciado que ocorreu um aumento na resposta de macrófagos em diferentes espécies. Contudo, não está evidenciado como o MOS age para modificar as respostas do sistema imunológico. Os vários efeitos imunológicos associados à administração desse aditivo na dieta sugerem que existe uma mobilização generalizada, tanto de linfócitos B quanto T.

Em experimentos realizados com leitões na fase de creche, por Santos et al. (2003), verificou-se que o uso de níveis crescentes de manose não afetou o desempenho mas reduziu acentuadamente a população bacteriana total do duodeno e jejuno, demonstrando seu potencial para melhorar a saúde animal por meio do bloqueio dos sítios de ligações entre bactérias patogênicas e o tecido hospedeiro. Os mesmos autores ainda verificaram que a manose na dieta influenciou positivamente a altura das vilosidades e a relação vilosidade/cripta.

Sanches et al. (2006) analisaram a inclusão de probiótico, prebiótico e simbiótico para leitões na fase de pós-desmame e verificaram que houve aumento de bactérias lácteas no jejuno, não tendo os parâmetros de desempenho e morfológicos sido afetados pelo uso dos aditivos.

Chiquieri et al. (2007) avaliaram a bioquímica sanguínea e a altura das vilosidades intestinais de suínos com peso inicial aproximado de 25 kg e final de 91 kg, alimentados com rações contendo probiótico, prebiótico e antibiótico, verificando que os tratamentos não tiveram efeitos sobre componentes sanguíneos e altura de vilosidades, nos suínos nas fases de crescimento e terminação.

Experimentos realizados por Castilho et al. (2008), utilizando mananoligossacarídeos (MOS) e zinco quelatado (Zn) como promotores de crescimento, controle de diarreia em leitões e função intestinal, verificaram que

os valores médios dos escores fecais foram melhorados com o uso do MOS e Zn. Neste mesmo trabalho, o uso do MOS promoveu menor contagem de enterobactéria e menor profundidade de criptas no jejuno com a combinação de MOS e Zn, não havendo diferença significativa para pH, ácidos graxos de cadeia curta e concentrações de imunoglobulinas no soro. O uso de MOS e Zn pode melhorar a eficiência de ganho durante o período inicial.

Os efeitos destas frações da fibra dietética (MOS) sobre a função digestiva e a ocorrência de diarreia após o desmame têm sido reconhecidos (PLUSKE et al., 2003). Dessa maneira, existe também demanda de pesquisa concernente ao efeito destes ingredientes sobre a microbiota de suínos.

Como ocorre com as outras fibras, prebióticos são resistentes à digestão enzimática nas primeiras porções do trato intestinal, sendo majoritariamente fermentados anaerobicamente no cólon. Há um efeito de aumento de volume pela produção de biomassa durante a fermentação e conseqüente aumento na frequência de evacuações, se adequando ao atual conceito de fibras (SAAD, 2006).

De acordo com Mikkelsen, Jakobsen e Jensen (2003), os trabalhos com oligossacarídeos têm resultados insuficientes ou conflitantes. Alguns autores relatam melhora no ganho de peso e redução de diarreia, enquanto outros observam pouco ou nenhum efeito. Conseqüentemente, a pesquisa tem sido direcionada no sentido de comprovar benefícios da adição destes produtos à dieta e elucidar os mecanismos pelos quais isso acontece. O estudo molecular da microbiota intestinal traz novas perspectivas para a pesquisa nesta área.

Técnicas de cultura de microrganismos podem não ser eficazes para a avaliação da possível modificação da microbiota ocasionada pelos promotores do crescimento, pois dependem de meios seletivos e outras condições artificiais de crescimento (PEDROSO et al., 2005).

2.6 Probióticos

De acordo com o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2002), probióticos são cepas específicas de várias espécies de microrganismos que atuam como auxiliares na recomposição da microbiota intestinal dos animais, reduzindo a atuação de bactérias patogênicas indesejáveis. Probióticos podem conter uma ou mais espécies de microrganismos (TURNER; DRITZ; MINTON, 2001).

Um dos mecanismos de ação dos probióticos é sua atividade antimicrobiana contra outras espécies. A produção de ácido láctico e acético pelas bactérias utilizadas no probiótico reduz o pH do trato intestinal, reduzindo o crescimento de vários patógenos e possibilitando o desenvolvimento de certas espécies de *Lactobacillus* (ATHERTON; ROBBINS, 1987). Substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, acidofilina, lactalina, peróxido de hidrogênio e toxinas letais para certos patógenos, também são produzidas por microrganismos de ação probiótica. Os probióticos também possibilitam a redução de substâncias tóxicas como, por exemplo, a amônia (VANBELLE; TELLER; FOCANT, 1990). Ainda segundo os mesmos autores, as bactérias produtores de ácido láctico podem aumentar a atividade de macrófagos e linfócitos.

Uma das ações de *Bacillus subtilis* é sua atuação sobre as funções imunes, proliferando leucócitos mononucleares, aumentando interferons e as células T, não estando ainda bem elucidado o mecanismo de ação para essas alterações. *Bacillus subtilis* produz catalases e enzimas, as quais possibilitam o crescimento de lactobacilos. Na sua forma de esporos, essas células são metabolicamente inativas e mais tolerantes às ações letais do calor, frio, radiação, barreiras gástricas e podem ser armazenadas sem refrigeração por

longos períodos. No intestino, os esporos germinam, sendo a forma pelo qual ocorrem os efeitos probióticos (SANDERS; MORELLI; TOMPKINS, 2003).

De acordo com Huyghebaert (2003), a exclusão competitiva se aplica a microrganismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, pois são bactérias que, como os principais patógenos, colonizam o trato intestinal, aderindo por meio de fimbrias ao epitélio intestinal. Porém, *Bacillus* spp. e a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) são microrganismos não colonizadores que apenas transitam pelo intestino, juntamente com o conteúdo intestinal e não aderem ao epitélio.

Resultados de desempenho são muito inconsistentes com o uso de probióticos, tanto para suínos como para aves (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 1998). A espécie de microrganismo utilizada no probiótico, históricos de doenças, condição sanitária e temperatura das instalações podem interferir na ação dos promotores de crescimento, bem como nos probióticos (NRC, 1998). Outro aspecto a ser considerado é se esse probiótico faz parte da microbiota natural do hospedeiro e se a quantidade inoculada foi suficiente (COLLINS; GIBSON, 1999).

O uso de antimicrobianos e outros microingredientes associados aos probióticos, a sua composição, seu processamento nas dietas e o manejo da alimentação podem também explicar parte da inconsistência de resultados (CHEESON, 1994). Vários microrganismos probióticos não resistem a antibióticos e à peletização (TURNER; DRITZ; MINTON, 2001).

Existem vários tipos de probióticos no mercado; a maioria é composta de *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* ou, mesmo, *Saccharomyces cerevisiae*.

Utiyama et al. (2006) estudaram os efeitos de probióticos, prebióticos e extratos vegetais para leitões na pós-desmama e verificaram que prebióticos podem ser utilizados para leitões recém-desmamados como alternativa aos antibióticos, porém, os probióticos não apresentaram nenhum benefício para os

animais, devendo este ser mais estudado, adequar melhor os microrganismos e a quantidade a ser adicionada à dieta de acordo com cada desafio encontrado.

2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação (DGGE)

O uso de técnicas biológicas moleculares baseadas na análise do rRNA e rDNA 16S tem favorecido a caracterização de comunidades bacterianas. Estudos recentes demonstraram que a eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) é uma ferramenta que pode ser usada para o exame de comunidades microbianas complexas (SIMPSON et al., 1999).

A amplificação por PCR (*Real Time-PCR*) com o uso de iniciadores universais permite a identificação de espécies pelo sequenciamento das regiões hipervariáveis, o que também pode ser feito por meio de uma abordagem menos laboriosa com base em DGGE. Alternativamente, iniciadores para a região hipervariável específicos para espécies, permitem a identificação direta de organismos em particular. O desenvolvimento paralelo de ferramentas de bioinformática é fundamental para uma exploração eficiente dessas informações (HART et al., 2002).

A análise molecular da microbiota intestinal tem se demonstrado uma importante ferramenta para monitoramento dos efeitos da dieta e de fatores ambientais na saúde e no desempenho dos animais (KONSTANTINOV et al., 2004). Com o objetivo de superar as limitações das metodologias baseadas em cultura, a abordagem molecular tem sido usada na caracterização da microbiota intestinal, incluindo bactérias cultiváveis ou não. Embora algumas desvantagens sejam observadas nestes métodos, estudos independentes de cultura, focados na microbiota intestinal, têm favorecido o entendimento da ecologia microbiana do trato gastrintestinal.

O conhecimento crescente da microbiota intestinal inclui a diversidade, a filogenia, a distribuição e a análise do sucesso de amostras de probióticos assim como a influência da idade do animal, dieta e administração de antimicrobianos (GONG et al., 2007), de acordo com os mesmos autores, a diversidade e a complexidade da estrutura da comunidade intestinal das bactérias têm se mostrado muito maiores que o que fora antes reportado em estudos baseados em cultura. A identificação dos grupos de bactérias predominantes em cada segmento do trato gastrointestinal estudado foi feita por Gong et al. (2007) e estes dados podem ter implicações importantes para a saúde e a nutrição de frangos de corte, sendo particularmente relevantes no desenvolvimento de probióticos e seu uso mais efetivo nesta espécie.

A partir dos perfis de DGGE gerados dos diversos compartimentos intestinais, foi possível observar diferenças nos padrões de bandas. Muitos produtos únicos de PCR foram obtidos de regiões em separado. Como esperado, os padrões luminiais se aproximavam aos da mucosa dentro de cada compartimento e uma mudança geral foi observada entre uma seção e outra adjacente. Enquanto um número de bandas comuns foi encontrado por meio dos perfis, houve distintas bandas de produtos de PCR encontradas em uma única região ou seção. Essas diferenças se correlacionam às mudanças na microbiota natural, em função de sua localização no trato gastrointestinal (SIMPSON et al., 1999).

O fenômeno no qual uma microbiota estável previne a colonização por patógenos é denominado “resistência à colonização“. Com base nesta premissa, Konstantinov et al. (2004) deram atenção especial, em seus estudos, às questões relacionadas à extensão em que carboidratos não digestíveis fermentáveis podem influenciar a microbiota do trato gastrointestinal de suínos. A adição de carboidratos fermentáveis levou ao enriquecimento do intestino delgado em

lactobacilos e a um rápido incremento na diversidade da microbiota do cólon (KONSTANTINOV et al., 2004).

Pesquisas têm demonstrado que bactérias do trato gastrintestinal estão envolvidas na expressão gênica de células epiteliais. Essa comunicação entre bactérias e hospedeiro pode, no futuro, fornecer respostas para questões sobre como o sistema imune do hospedeiro reconhece esta microbiota e como esta percebe a tolerância por parte do mesmo (KONSTANTINOV et al., 2004).

Pesquisas interdisciplinares envolvendo nutricionistas, imunologistas e microbiologistas são necessárias à compreensão da complexa interação entre a microbiota e o hospedeiro (KONSTANTINOV et al., 2004).

A utilização de novas técnicas permite, ainda, a criação de bibliotecas de sequências de rDNA 16S clonadas de amostras da microbiota gastrintestinal de suínos e sua comparação com outras sequências depositadas em bancos públicos de dados. Isso permite a observação das diferenças entre as comunidades estudadas e, mesmo, dentro de espécies habitantes do trato gastrintestinal de suínos.

O entendimento da interação de alimentos funcionais com microrganismos e o hospedeiro são importantes no uso de aditivos alternativos de forma que possa favorecer um bom desempenho animal. As técnicas moleculares constituem uma útil ferramenta de bioprospecção, permitindo melhor conhecimento da biodiversidade microbiana, fornecendo uma nova visão dentro desse complexo ecossistema.

Dessa forma, fazem-se necessárias pesquisas no campo da biologia molecular para que possam ser identificadas as comunidades bacterianas, possibilitando, assim, o uso de aditivos alternativos aos antibióticos, evitando, assim, resistência microbiana e resíduos nos produtos de origem animal.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis:** agricultural chemicals, contaminants and drugs. Arlington, 2002. v. 1, 684 p.
- ATHERTON, D.; ROBBINS, S. Probiotics: a European perspective. In: LYONS, T. P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry**. Nicholas: Alltech Technical, 1987. p. 166-176.
- BARGER, A. M. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. **Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 1207-1222, 2003.
- BONTEMPO, V. et al. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 129, n. 3/4, p. 224-236, Sept. 2006.
- BURGER, S. **Is early introduction of supplement from a feeding program detrimental or beneficial to children?** 1992. 165 f. Thesis (Ph.D. in Human Development and Family Studies) - Cornell University, Ithaca, 1992.
- CASTILHO, M. et al. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 94-101, Oct. 2008.
- CHEESON, A. Probiotics and other intestinal mediators. In: COLE, D. J. A.; WISEMAN, J.; VARLEY, M. A. (Ed.). **Principles of pigs science**. Nottingham: University of Nottingham, 1994. p. 197-214.
- CHIQUIERI, J. et al. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 97-104, 2007.
- COLLIER, C. T. et al. Molecular ecology analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 3035-3045, Dec. 2003.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics and symbiotics approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 69, n. 1, p. 1052-1054, 1999. Supplement.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Microingredientes de alimentação animal**. Brasília: CARC, 1998. 45 p.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 217 p.

EDENS, F. W. An alternative for antibiotics use in poultry: probiotics. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Hematologia e imunologia. In: _____. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, p. 1881-1957.

GABLER, N. K.; SPURLOCK, M. E. Integrating the immune system with the regulation of growth and efficiency. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. E64-E74, 2008. Supplement.

GANNER, A. et al. Effect of yeast cell wall fractions on innate and adaptive immunity of weaning piglets. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DE LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: CNBA, 2009. p. 155-156.

GONG, J. et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 147-157, Feb. 2007.

HART, A. L. et al. The role of the gut flora in health and disease and its modification as therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, San Francisco, v. 16, n. 4, p. 1383-1393, Aug. 2002.

HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry. In: EASTERN NUTRITION CONFERENCE, 4., 2003, Quebec. **Proceedings...** Quebec: UON, 2003. p. 1-23.

ITOH, H. K. et al. The influence of age and health status on the serum alpha-1 acid acylglycoprotein levels of conventional and specific pathogen free pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 57, n. 2, p. 74-78, Apr. 1992.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. 417 p.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2007. 729 p.

KONSTANTINOV, S. R. et al. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. **Animal Research**, Les Ulis, v. 53, n. 4, p. 317-324, July/Aug. 2004.

KRAUSE, D. O.; GASKINS, R. H.; MACKIE, R. I. Prokaryote diversity of gut mucosal biofilms in the human digestive yeast fermentation products for piglets in biofilms in the food environment. **Blackwell Scientific**, Ames, v. 22, p. 127-152, Dec. 2006.

LANCINI, J. B. Fatores exógenos na função gastrointestinal: aditivos. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA. **Fisiologia da digestão e absorção de aves**. Campinas, 1994. p. 99-126.

LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. **Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology**. Iowa: Iowa State, 2003. 448 p.

LEAHY, S. C. et al. Getting better with bifidobactéria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 6, p. 1303-1315, July 2005.

LILLIEHÖÖK, I.; TVEDTEN, H. Investigation of hypereosinophilia and potential treatments. **Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 1359-1378, Dec. 2003.

LOPES, S. T. dos A. et al. **Patologia clínica veterinária**. Santa Maria: UFSM, 1996. 166 p.

MACHADO, G. S.; FONTES, D. O. Interações entre sanidade, ativação imunológica, produção e nutrição de suínos: uma nova abordagem. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE SUINOCULTURA, 1., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2005. p. 130-148.

MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B. F.; ZINKEL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p. 1055-1063.

MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001. p. 364-373.

MIKKELSEN, L. L.; JAKOBSEN, M.; JENSEN, B. B. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of pigs post-weaning. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 144-150, 2003.

MILTENBURG, G. Extratos herbais como substitutivos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 19., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CNBA, 2000. p. 87-100.

MORAN, C.; VEIGA, A. Mananas: a estrutura define sua função e com a glicômica atua na resistência a doenças. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DE LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: CNBA, 2009. p. 91-98.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase protein in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, n. 1, p. 28-39, July 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriment of swine**. Washington: National Academy, 1998. 189 p.

PEDROSO, A. A. et al. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 4, p. 1224-1233, set. 2005.

PETTIGREW, J. E. Bio-Mos effects on pig performance: a review. In: BIOTECHNOLOGY IN FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 16., 2000, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2000. p. 31-34.

PIE, S. et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 3, p. 641-647, Mar. 2004.

PLUSKE, J. R. et al. Effects of different sources and levels of dietary fibre in diets on performance, digesta characteristics and antibiotic treatment of pigs after weaning. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 107, n. 1/4, p. 129-142, 2003.

SAAD, S. M. I. Prebióticos e probióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./fev. 2006.

SANCHES, A. L. et al. Utilização de probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 774-777, jul./ago. 2006.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeforms as human probiotics: bacillus, sporolactobacillus and brevibacillus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 2, n. 3, p. 101-110, July 2003.

SANTOS, W. G. et al. Manose na alimentação de leitões na fase de creche: desempenho, pH do trato gastrintestinal e peso de órgãos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 696-702, maio/jun. 2003.

SAUBER, T. E.; STAHLY, T. S.; NONNECKE, B. J. Effect of level of chronic immune system activation on the lactation performance of sows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 8, p. 1985-1993, Aug. 1999.

SHELDON, I. N. et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **Veterinary Record**, London, v. 148, n. 6, p. 172-175, Feb. 2001.

SILVA, E. N. Antibióticos intestinais naturais: bacteriocinas. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 30., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: CABN, 2000. p. 15-24.

SIMPSON, J. M. et al. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 167-179, Mar. 1999.

SPRING, P. The effect of dietary Mannanligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella: challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 205-211, Feb. 2000.

SPRING, P.; PRIVULESCU, M. Mannanligosaccharide: its logical role as natural feed additive for piglets. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY ANNUAL SYMPOSIUM, 13., 1998, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 1998. p. 553.

TANNOCK, G. W. Studies of intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 6, p. 527-533, 1998.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

TURNER, J. L.; DRITZ, P. S. S.; MINTON, J. E. Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. **The Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 17, n. 4, p. 217-226, Dec. 2001.

UTIYAMA, C. E. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microflora intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, nov./dez. 2006.

VANBELLE, M.; TELLER, C.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 40, n. 7, p. 543-670, July 1990.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. 377 p.

WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2273-2278, Sept. 1996.

CAPITULO 2

**USO DE PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E ANTIBIÓTICOS EM
DIETAS PARA LEITÕES NA FASE DE CRECHE, SOB PARÂMETROS
DE DESEMPENHO, SANGUÍNEOS E DIARRÉIA**

Santos, A. V.; Lima, J. A.F.; et al.

RESUMO

Um experimento foi conduzido para avaliar a adição do prebiótico mananoligossacarídeo (MOS 0,2%), probiótico (*Bacillus subtilis* 30g/tonelada) e antibiótico (bacitracina de zinco 125g/tonelada) na ração para leitões na fase de creche. Foram utilizados 80 leitões (Danbroad x Agroceres), sendo 40 machos e 40 fêmeas, com peso inicial de $7,1 \pm 0,0175$ kg. O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, contendo quatro tratamentos e cinco repetições, sendo: 1 - controle; 2 - prebiótico; 3 - probiótico e 4 - antibiótico. Foi abatido um animal por parcela, aos 29, 36 e 54 dias de idade. As variáveis avaliadas foram ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD), conversão alimentar (CA), consistência fecal, leucometria global e imunoglobulinas. Aos 43 dias de idade, os animais apresentaram o mesmo ganho de peso ($P > 0,05$), porém, a dieta contendo prebiótico aumentaram o consumo ($P > 0,05$); a conversão alimentar foi melhor na dieta controle ($P < 0,05$). No período de 54 dias de idade dos animais, não houve diferença para ganho de peso diário ($P > 0,05$), consumo de ração diário ($P > 0,05$) e conversão alimentar ($P > 0,05$). Não houve diferença para consistência fecal ($P > 0,05$). O número de leucócitos aumentou aos 32 dias de idade, quando as dietas contendo prebióticos e probióticos foram utilizadas ($P > 0,05$). A ração contendo prebiótico aumentou o número de monócitos ($P < 0,05$) e a dieta contendo antibiótico proporcionou maior número de basófilos ($P < 0,05$), aos 36 dias de idade dos animais; O número de linfócitos não foi alterado pelas dietas experimentais ($P > 0,05$). As dietas não promoveram alterações nas imunoglobulinas IgA, IgM e IgG ($P > 0,05$). Conclui-se que o uso de prebióticos, probióticos e antibióticos não influenciou no desempenho dos animais dos 22 aos 54 dias de idade. Não foi possível encontrar efeito para a consistência fecal.

Palavras-chave: Aditivos. Consistência fecal. Imunoglobulinas. Suínos.

ABSTRACT

An experiment was conducted to evaluate the addition of the prebiotic mannanoligosaccharide (MOS 0.2%), probiotic (*Bacillus subtilis* 30g/ton) and antibiotic (Bacitracin zinc 125g/ton) in the piglets' feed in the post-weaning phase. 80 pigs (Danbread x Agroceres) were used, that is, 40 males and 40 females, initial weight of 7.1 ± 0.0175 kg. The utilized design was randomized blocks with four treatments and five replicates: 1 - Control 2 - Prebiotic 3 - Probiotic 4 - Antibiotic. One animal per plot was slaughtered at 29, 36 and 54 days old. The variables evaluated were average daily gain (ADG), daily feed intake (DFI), feed conversion (FC) fecal consistency, and overall leukocyte and immunoglobulins. At 43 days old, the animals presented the same weight gain ($P > 0.05$), however, on the diet containing prebiotic, they increased consumption ($P > 0.05$), feed conversion was better in the control diet ($P < 0.05$). In the period of 54 days of age of the animals, there were no differences in daily weight gain ($P > 0.05$), daily feed intake ($P > 0.05$) and feed conversion ($P > 0.05$) and also no differences in fecal consistency ($P > 0.05$). The number of leukocytes increased at 32 days of age when the diets containing prebiotics and probiotics were used ($P > 0.05$). The diet containing prebiotics increased the number of monocytes ($P < 0.05$) and the diet containing antibiotic provided greater number of basophiles ($P < 0.05$) at 36 days of age of the animals. The number of lymphocytes was not altered by the experimental diets ($P > 0.05$), the diets promoted no changes in the immunoglobulins IgA, IgM and IgG ($P > 0.05$). It follows that use of prebiotics, probiotics and antibiotics did not influence the animals' performance from 22 to 54 days old and it was not possible to find any effect for fecal consistency.

Keywords: Additives, Fecal consistency, Immunoglobulins, Pigs.

1 INTRODUÇÃO

É possível encontrar, na prática, o uso de antibióticos como promotores de crescimento nas rações de suínos, por mais que esta medida de manejo não seja aceita por países desenvolvidos, principalmente União Européia que, por sua vez, restringe a importação de produtos de origem animal nessas condições. A alegação recai, principalmente, no fato de que muitos antibióticos usados de forma contínua oferecem resistência cruzada para muitas cepas de bactérias. Por outro lado, as justificativas para o uso dos antibióticos ocorre pelo fato de que os mesmos podem eliminar ou, até mesmo, controlar microrganismos que promovem perdas no desempenho animal.

A busca por aditivos alimentares alternativos aos antibióticos se faz necessária devido a exigências de países importadores, sob alegações de resistência bacteriana, bem como, até mesmo no Brasil, têm surgido, nos últimos anos, relatos de bactérias resistentes a antibióticos e culminado em muitas complicações hospitalares. Assim, o uso de alternativos, como probióticos e prebióticos, entre outros, é uma alternativa viável, obtendo-se, assim, alimentos mais saudáveis isentos de resíduos de antibióticos (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Nos últimos anos, o conceito de alimentos funcionais passou a concentrar-se de maneira intensiva nos aditivos alimentares que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal, sendo os prebióticos e probióticos os aditivos que compõem esse tipo de alimentos funcional (SAAD, 2006).

O uso de probióticos pode resultar numa melhora no ganho de peso e diminuição de diarreia em animais jovens, bem como atuar na proteção de animais adultos à colonização com certos patógenos, como *Escherichia coli* O157:H7 (BROWN; BAKER; BARKER, 2007).

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho, a consistência fecal e os parâmetros sanguíneos de suínos na fase de creche, suplementados com prebióticos, probióticos e antibióticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, instalações e animais

O experimento foi realizado no Centro Experimental de Suínos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. O experimento foi conduzido no galpão de creche, em 20 baias suspensas (2,0 x 1,5 m), sendo o piso de concreto armado, totalmente ripado, equipadas com comedouros semiautomáticos e bebedouro tipo “chupeta”. Antes de alojar os animais, realizou-se limpeza e a desinfecção da creche. Esta limpeza foi realizada com lavagem dos comedouros com água e sabão; as baias foram lavadas com água corrente e, em seguida, aplicada cal hidratada nas paredes e no piso, permanecendo vazia por um período de sete dias. Neste ambiente de experimento, foram observadas as temperaturas mínima e máxima diariamente, por meio de termômetro colocado no interior da instalação. A temperatura da sala foi parcialmente controlada através de ventiladores, lâmpadas e manipulação das janelas, de modo que a temperatura estivesse dentro da zona de conforto recomendada para cada fase. A ração e a água foram fornecidas à vontade.

Utilizou-se 80 leitões (Danbred X Agroceres), selecionados de um total de 2.000 animais, oriundos de uma granja comercial da região sul de Minas Gerais, próxima à Universidade Federal de Lavras. Os animais foram pesados individualmente, identificados por meio de brincos e distribuídos em cinco blocos, em função do peso e da idade, totalizando 80 animais.

2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 machos e 40 fêmeas, desmamados aos 22 dias de idade, com peso inicial de $7,1 \pm 0,017$ kg. O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, sendo quatro tratamentos (1 - controle, 2 - prebiótico, 3 - probiótico e 4 - antibiótico) e cinco repetições. Os animais foram pesados individualmente e distribuídos em cinco blocos em função do peso. A baía representou a parcela experimental, composta por quatro animais, sendo dois machos e duas fêmeas.

2.3 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, óleo e núcleo comercial suplementadas com vitaminas, minerais e aminoácidos de forma a atender as exigências mínimas nutricionais dos leitões, durante o período de creche, ou seja, dos 22 aos 60 dias de idade, segundo a National Research Council - NRC (1998). A composição das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 1.

As dietas foram: 1 - dieta basal, 2 - dieta basal + prebiótico 0,2% (manano oligossacarídeo), 3 - dieta basal + probiótico (*Bacillus subtilis* 30g/tonelada) e 4 - dieta basal + antibiótico (bacitracina de zinco 125 g/tonelada).

A composição, em microrganismos, do probiótico adicionado às dietas dos leitões e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de produto (Calsporin®) foi de 1×10^{10} UFC/g.

Tabela 1 Composição das dietas experimentais

Ingrediente (%)	Dietas	
	Pré-inicial	Inicial
Milho moído	35,00	44,50
Farelo de soja	20,00	29,00
Açúcar	3,00	3,00
Óleo de soja	2,00	1,50
Núcleo pré-inicial leitões	40,00	20,00
Núcleo inicial	-	2,00
Total	100,00	100,00
Níveis nutricionais		
PB (%)	20,00	21,13
EM kcal/kg	3.560	3.428
Cálcio (%)	0,60	0,69
Fósforo disponível (%)	0,50	0,46
Lisina digestível	1,282	1,226
Met+ Cis digestível	0,779	0,711
Treonina digestível	0,850	0,804
Triptofano digestível	0,271	0,258

Núcleo pré-inicial – Composição: soro de leite em pó desnatado, leite em pó integral, leite desnatado em pó, colina, soja extrusada, milho pré-gelatinizado, açúcar, ácido fumárico, óleo vegetal, fosfato bicalcico, treonina, triptofano, calcário calcítico, premix mineral, L-lisina, premix vitamínico, cloreto de sódio, DL-metionina, hidróxido de tolueno butilato (B.H.T.) – Níveis por kg de produto: Vitamina A (360.000U.I.), Vitamina D3 (7.500U.I), Vitamina E (450 mg), Vitamina K3 (18 mg), Tiamina (12 mg), Riboflavina (29,5 mg), Piridoxina (13,5 mg), Vitamina B12 (0,01 mg), Niacina (118 mg), Ácido Pantotênico (47,5 mg), Ácido fólico (3,25 mg), Biotina (0,75 mg), Vitamina C (300 mg), Colina (1.500 mg), B.H.T. (300 mg), Ferro (875mg), Cobre (625 mg), Manganês (180 mg), Zinco (625 mg), Cobalto (3,25 mg), Selênio (1 mg).

Núcleo inicial – Composição: ácido fólico, ácido pantotênico, bitotina, calcário calcítico, caulín, cloreto de colina, cloreto de sódio, fosfato bicálcico, aditivo antioxidante (B.H.T.), iodato de cálcio, niacina, óxido de zinco, vitamina B6, vitamina B2, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de ferro, vitamina B1, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3. Níveis por kg do produto: Ácido fólico (39 mg), ácido pantotênico (625 mg), B.H.T. (1.500), biotina (8 mg), cálcio (145 mg), cobalto (10 mg), cobre (4.375 mg), colina (9.000 mg), ferro (2.780 mg), fósforo (41 mg), iodo (45 mg), manganês (1.360 mg), niacina (1.250 mg), selênio (13 mg), sódio (41 g), vitamina A (380.000U.I), vitamina B1 (60 mg), vitamina B12 (940 mcg), vitamina B2 (310 mg), vitamina B6 (80 mg), vitamina C (1250 mg), vitamina D3 (60.000 U.I), vitamina E (1.250 mg), vitamina K3 (125 mg), zinco (3.750 mg).

2.4 Coleta de amostras e análises laboratoriais

Após jejum de 8 horas, realizou-se a eutanásia de um animal por parcela, aos 29, 36 e 54 dias de idade, para coleta das amostras de sangue. Os procedimentos de abate dos animais para a coleta das amostras seguiram as recomendações aprovadas pelo comitê de ética da Universidade Federal de Lavras, Protocolo nº 018/2010.

As variáveis de desempenho analisadas foram o ganho de peso diário (GPD), o consumo diário de ração (CRD) e a conversão alimentar (CA). O desempenho foi obtido após a pesagem dos animais, medindo-se o fornecimento e as sobras de ração. As sobras foram coletadas, secadas e pesadas, descontando-se do total fornecido para a determinação do consumo real. A conversão alimentar foi obtida pela relação consumo/ganho de peso no período.

No momento do abate, os animais foram insensibilizados e procedeu-se a sangria, na veia jugular. Duas amostras de sangue contendo 10 mL foram coletadas em tubo de ensaio, uma contendo anticoagulante EDTA e outra sem EDTA; uma terceira amostra de sangue foi coletada em tubo de ensaio sem anticoagulante, para a obtenção do soro e análise das imunoglobulinas.

As análises de imunoglobulinas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Após a coagulação, os soros foram separados e armazenados a -20°C até o momento do uso. A concentração foi determinada no soro pela técnica de ELISA método indireto, com o uso de kits comerciais para detecção de imunoglobulinas de suínos (Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, TX), o anticorpo primário foi o de suínos e o secundário IgG de coelho anti-Ig de suíno. As análises foram realizadas em duplicata.

Para as análises de leucócitos totais, as amostras foram remetidas ao laboratório Santa Cecília no município de Lavras, MG, onde foi determinada e quantificados leucócitos totais por meio da técnica de citometria de fluxo,

estabelecendo-se as quantidades de leucócitos totais, eosinófilos, monócitos, basófilos e linfócitos por mm^3 de sangue.

Para a análise da consistência fecal, as fezes foram classificadas diariamente nas baias, em uma escala de 0 a 3, em que 0 e 1 foi adotado para fezes normais, 2 para pastosas e 3 para aquosas.

Com relação às variáveis sanguíneas, foi avaliada a leucometria global, valores de leucócitos totais, monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos.

2.5 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o PROC GLM do pacote estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2001). Os dados foram submetidos à análise de variância global com todos os tratamentos, a fim de se obter o quadrado médio do resíduo. Para as variáveis de desempenho, aplicou-se o teste de Tukey, a 5%.

Para as variáveis sanguíneas leucócitos totais e imunoglobulinas, foi utilizada a opção de transformação raiz quadrada de $x+0,5$; para a obtenção da normalidade, utilizou-se o teste de Tukey, a 5%. A consistência fecal foi submetida à análise não paramétrica (qui quadrado), sendo as médias comparadas pelo teste Kruskal-Walis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de desempenho para sendo ganho de peso médio diário (GPMD), consumo médio diário (CRMD) e (CA) encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 Desempenho de leitões dos 22 aos 43 dias de idade, recebendo prebiótico, probiótico e antibiótico nas rações¹.

Dieta experimental	GPMD (g/d)	CRMD (g/d)	CA
Controle	307	406b	1,32a
Prebiótico	322	512a	1,59b
Probiótico	279	446ab	1,59b
Antibiótico	316	467ab	1,47ab
CV (%)	9,91	10,34	6,35

¹Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As dietas não influenciaram no ganho de peso dos animais aos 43 dias de idade dos animais ($P > 0,05$); o maior consumo de ração ($P < 0,05$) ocorreu na dieta contendo prebiótico e a dieta controle apresentou melhor conversão ($P < 0,05$) em relação às demais dietas na fase de 22 a 43 dias dos leitões. Esse maior consumo pode estar relacionado com maior formação de biomassa, maior fermentação e maior evacuação, tendo um comportamento semelhante ao de fibras (SAAD, 2006).

Resultados semelhantes foram encontrados por Utiyama et al. (2006) com o uso de antimicrobianos e prebióticos, em que observou maior consumo de ração em leitões na fase de creche.

O uso de *Bacillus toyoi* foi testado por Fedalto, Tracz e Ader (2002) como probiótico e comparado com antibiótico no premix. Não foram observadas

diferenças no desempenho de leitões na pós-desmama, o que concorda com os resultados.

Pesquisas com carboidratos funcionais, de forma geral, demonstram que os mesmos auxiliam na comunicação celular e, de forma específica, interagem com esses sistemas de proteção, dando um suporte eficiente para fortalecer a defesa intestinal e promover a boa saúde animal (MORAN; VEIGA, 2009).

Resultados semelhantes para ganho de peso médio diário e conversão alimentar também foram obtidos por Santos et al. (2003), quando utilizaram níveis de manose de 0% a 0,2%.

Sanches et al. (2006) utilizaram, na dieta de leitões, probiótico, prebiótico e simbiótico na fase de pós desmame e verificaram que o tratamento controle e o tratamento contendo antibiótico apresentaram a mesma resposta para desempenho. Mikkelsen, Jakobsen e Jensen (2003) compararam a utilização de dois prebióticos distintos para leitões desmamados e não observaram diferenças significativas sobre no desempenho dos animais.

Na Tabela 3, são apresentados os resultados de desempenho no período de 22 a 54 dias de idade.

Tabela 3 Desempenho de leitões dos 22 aos 54 dias de idade, recebendo prebiótico, probiótico e antibiótico¹.

Tratamento	GPMD (g/d)	CRMD (g/d)	CA
Controle	370	616	1,66
Prebiótico	418	656	1,57
Probiótico	388	578	1,49
Antibiótico	415	616	1,48
CV (%)	11,53	7,24	10,58

De acordo com os resultados na Tabela 3, não houve diferença ($P>0,05$) para as dietas testadas no período de 22 a 54 dias de idade.

Animais desmamados e alojados em gaiolas com diferentes leitegadas apresentaram melhora no GPMD e CRMD recebendo probióticos (ESTIENNE; HARTSOCK; HARPER, 2005). Porém, não foram observadas melhoras no desempenho por Taras, Vahjen e Simon (2006).

Em experimentos realizados por Santos et al. (2003) com leitões na fase de creche e utilizando manose não foram encontradas diferenças no desempenho dos animais, durante a fase de creche.

Morais et al. (2010) utilizaram probióticos combinados com *Bacillus subtilis* na dieta de leitões na fase de creche e não encontraram efeitos para desempenho e diarreia.

Apesar de ter ocorrido um maior consumo aos 43 dias de idade dos animais na dieta contendo prebiótico, porém, sem refletir em ganho de peso dos animais e na conversão alimentar, do ponto de vista prático, essa não é interessante em condições de campo.

O bom status sanitário do local experimental bem como dos animais é que, possivelmente, proporcionou equilíbrio entre as dietas testadas, contribuindo, assim, para uma boa resposta dos animais, sem haver diferença significativa entre as dietas.

3.1 Consistência fecal

Resultados das consistências fecais, no período de 22 a 54 dias de experimento, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 Consistência fecal % de leitões na fase de creche, no período de 22 a 54 dias de idade.

Tratamento	Escore(%)			
	0	1	2	3
Controle	93,0	6,0	1,0	0,0
Prebiótico	84,0	12,0	3,0	1,0
Probiótico	85,0	11,0	3,0	1,0
Antibiótico	82,0	12,0	5,0	1,0
P =	0,2928	0,4813	0,4662	0,9074

¹ Não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)

De acordo com os dados da Tabela 4, não houve efeito significativo na consistência fecal para as dietas testadas nos animais pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). As condições sanitárias das instalações e dos animais podem ter sido determinantes para a não apresentação de um quadro de diarreia, não permitindo, assim, observar ação dos aditivos utilizados.

De acordo com Taras, Vahjen e Simon (2006), o uso de probióticos utilizados em suínos e aves tem efeito positivo na consistência das fezes, em alguns casos podendo até surtir efeito positivo no desempenho animal. Ainda de acordo com os mesmos autores, os efeitos positivos no uso de probióticos são mais bem evidenciados em animais que apresentam diarreia. Na presente pesquisa, a não evidência de diarreias pode estar relacionada à baixa incidência de bactérias enteropatogênicas, não refletindo em diferenças entre desempenho dos animais.

Em pesquisas realizadas por Taras, Vahjen e Simon (2007), utilizando probióticos, houve melhora significativa na incidência de diarreia no pós-desmame de leitões, quando comparado com o grupo controle. Estes resultados mostraram que os probióticos podem influenciar positivamente na saúde de

leitões, quando utilizados com conceito amplo, associando manejo e outros aditivos na dieta dos animais. A espécie de microrganismo utilizada como probiótico, os históricos de doenças, a condição sanitária e a temperatura das instalações podem interferir na ação dos promotores de crescimento (NRC, 1998).

3.2 Leucomentria global e imunoglobulinas

Na Tabela 5 observam-se os valores para leucócitos totais dos leitões, nos períodos de 7, 14 e 32 dias de experimento.

Tabela 5 Leucócitos totais, (células/mm³) aos 7, 14 e 32 dias de experimento, de leitões recebendo prebiótico, probiótico e antibiótico.

Dietas	Período (dias)			Média
	7	14	32	
Leucócitos				
Controle	17,1	20,2	16,3 B	17,9
Prebiótico	16,8 b	18,8 b	25,6 Aa	20,4
Probiótico	13,8 b	17,0 b	27,6 Aa	19,5
Antibiótico	12,6 b	20,5 a	22,5 ABa	18,5
Média	15,1	19,1	23,0	
P =	0,0001			
CV (%)	12,36			
Monócitos				
Controle	0,90	1,92	3,02	1,95 BC
Prebiótico	2,52	3,14	4,46	3,37 A
Probiótico	0,56	1,30	3,36	1,74 C
Antibiótico	1,48	1,66	4,02	2,39 B
Média	1,37 b	2,01 b	3,72 a	
P =	0,0000			
CV (%)	22,34			
Eosinófilos				
Controle	0,42	0,64 B	0,52	0,53
Prebiótico	0,42 b	1,28 Aa	0,32 b	0,67
Probiótico	0,32	0,44 B	0,50	0,42
Antibiótico	0,46	0,52 B	0,70	0,56
Média	0,41	0,72	0,51	
P =	0,0270			
CV (%)	15,31			
Basófilos				
Controle	0,96	0,34 AB	0,16	0,49
Prebiótico	0,36	0,06 B	0,20	0,21
Probiótico	0,22	0,32 AB	0,38	0,31
Antibiótico	0,20	1,30 A	0,72	0,74
Média	0,44	0,51	0,37	
P =	0,0306			
CV (%)	27,77			
Linfócitos				
Controle	64,8	59,6	78,9	67,8
Prebiótico	69,8	63,2	74,3	69,1
Probiótico	64,2	63,3	75,6	67,7
Antibiótico	66,5	61,6	77,3	68,5
Média	66,3 b	61,9 b	76,5 a	
P =	0,0002			
CV (%)	3,46			

¹ Médias seguidas de letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os valores encontrados para leucócitos totais apresentaram-se dentro da normalidade para a espécie pesquisada e idade, de acordo com Feldman et al. (1986).

Na presente pesquisa, observa-se, por meio dos resultados, que houve maior resposta para leucócitos, nos tratamentos que receberam prebióticos e probióticos, seguidos do tratamento contendo antibiótico e controle, aos 54 dias de idade dos animais.

As principais células de defesa do organismo são representadas pelos leucócitos, incluindo linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (LATIMER; MAHAFFEY; PRASSE, 2003). *Spray dry* e extratos herbais foram testados em leitões na desmama, porém, sem desafios aos animais, por Nofrarias et al. (2006), que constataram maiores valores para as concentrações de leucócitos totais, bem como para linfócitos, nos períodos de 14 e 21 dias de experimento, quando comparados ao primeiro dia de experimento.

O efeito imunestimulante em animais e no homem pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos com características probióticas interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN; HOLGADO, 2000). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002).

Pesquisas realizadas por Chiquiere et al. (2007) verificaram maior número de leucócitos na dieta controle em relação às demais rações contendo promotores de crescimento, justificando que há uma menor resposta do sistema imune onde não há tratamentos com promotores de crescimento.

A dieta contendo prebiótico apresentou maior estímulo para monócitos em comparação com as demais rações. Esse maior estímulo observado ao longo do período experimental pode estar relacionado à imunidade adaptativa.

Monócitos são células da resposta imune inata, portanto, já presentes antes de estímulos específicos (JAIN, 1993). Com o uso dos aditivos observou-se um aumento da resposta imune inata, de forma em geral.

Segundo Ganner et al. (2009), os valores elevados de monócitos podem intensificar a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos; prebióticos são capazes de modular o sistema imune inato e adaptativo.

De acordo com resultados na Tabela 5, percebe-se que a dieta contendo prebiótico apresentou valores de eosinófilos mais elevados em relação às demais dietas. Possivelmente, essa resposta é positiva para os animais aos 14 dias. Segundo Janeway et al. (2007), eosinófilos são células produzidas em grande número durante as respostas imunes. Elas migram da circulação para os locais de infecção e inflamação, onde são importantes contra infecções por parasitas e ou alérgenos. Segundo com Jain (1993), a produção e a liberação de eosinófilos são reguladas por linfocinas produzidas por linfócitos T-fator estimulador de colônia eosinofílica (Eos-CSF), eosinofiloipoietina e um fator de liberação de eosinófilos. Em processos parasitários, como em alérgicos, há interação de linfócitos, mastócitos, basófilos e eosinófilos. Os linfócitos T e os mastócitos são os que produzem eosinofiloipoietina, que atua na medula óssea, elevando a formação de eosinófilos (WILLARD; TVEDTEN; TURNWALD, 1994). Mesmo que os eosinófilos possam permanecer até duas semanas nos tecidos sob a influência das citocinas, permanecem apenas algumas horas no sangue (LILLIEHÖÖK; TVEDTEN, 2003).

De acordo com os resultados encontrados para basófilos, a dieta contendo prebiótico apresentou menor resposta em relação às demais rações. O

tratamento positivo contendo antibiótico apresentou maior resposta para basófilos.

Observando-se os valores para monócitos contidos na Tabela 5, verifica-se que, com o avançar da idade dos animais, naturalmente, eles apresentaram elevação nas concentrações. Contudo, essa tendência pode ser devido à exposição natural a antígenos, ao ambiente ou até mesmo à alimentação. Porém, estes resultados não apresentam relação direta com o desempenho dos animais no período experimental de 32 dias. No entanto, os valores foram maiores para a dieta contendo prebiótico, quando comparado aos demais.

Não foram encontradas diferenças para linfócitos, para as dietas avaliadas nos períodos testados, provavelmente porque não houve desafio e não estimulou a resposta imune adaptativa.

O uso de *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae* não alterou a percentagem de linfócitos B e monócitos (LESSARD et al., 2009).

Estudos recentes mostraram efeito positivo para o tratamento de *Escherichia coli* F4 em leitões desmamados com *Lactobacillus sobrius*, não somente sobre níveis patogênicos, como também no desempenho (KONSTANTINOV et al., 2008). No presente estudo, o uso de *Bacillus subtilis* pode ter contribuído para o equilíbrio da microbiota intestinal dos animais, favorecendo, assim, que não houvesse diferença entre as dietas.

Os valores de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM obtidos de leitões na fase de creche encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 Valores de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM(ng/ml) de leitões na fase de creche, nos períodos de 7, 14 e 32 dias de experimento.

Período	Dietas				Média	P	
	Controle	Prebiótico	Probiótico	Antibiótico			
<i>- IgA -</i>							
7	477	324	328	491	405 A	Trat	0,1753
14	496	500	592	666	564 B	Período	0,0002
32	604	598	610	530	586 B	T*P	0,1727
Média	526	474	510	563			
CV (%)	13,82						
<i>- IgG -</i>							
7	214	232	233	227	226 A	Trat	0,9035
14	273	239	206	232	238 AB	Período	0,0206
32	276	307	311	271	291 B	T*P	0,8115
Média	254	259	250	243			
CV (%)	15,47						
<i>- IgM -</i>							
7	491	592	571	372	506 A	Trat	0,1969
14	566	595	751	668	645 B	Período	0,0023
32	684	693	689	614	670 B	T*P	0,2763
Média	580	627	670	551			
CV (%)	12,81						

¹Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Analisando-se somente períodos, verifica-se que houve efeito ($P < 0,05$) para os períodos avaliados com maior estímulo ao sistema imune. Esta maior ativação do sistema imune pode estar relacionada com o desenvolvimento da imunidade adaptativa dos animais.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, não houve efeito entre os tratamentos ($P > 0,05$) para as imunoglobulinas analisadas.

Possivelmente, a ausência de diferenças nas concentrações de imunoglobulinas para as dietas testadas no presente estudo pode estar relacionada à baixa condição de desafio dada aos animais.

De acordo com Spring e Privulescu (1998), mananas aumentam a produção de imunoglobulinas (IgA) em diferentes condições de produção e em várias espécies animais. Esse aumento de imunoglobulinas confere maior aporte para a imunidade dos animais. Segundo Pettigrew (2000), lectinas bacterianas ligam-se às células epiteliais intestinais e auxiliam as bactérias na colonização. Dessa forma, se estiverem ligados ao mananoligossacarídeo, elas não poderão ligar-se às células epiteliais. Assim, as bactérias indesejáveis serão eliminadas do lúmen intestinal. De acordo com o mesmo autor, o MOS aumenta certas ações do sistema imune, estimulando a produção de imunoglobulinas IgA. No presente estudo, essas respostas também foram observadas nas concentrações aumentadas de leucócitos aos 32 dias de experimentos que receberam MOS, bem como para eosinófilos aos 36 dias de idade dos animais, ambos relacionados à imunidade dos animais.

Rodrigues et al. (2007), utilizando dois grupos de probióticos constituídos de cultivo viável misto de *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum* e o segundo composto por células inativadas de *Lactobacillus acidophilus*, verificaram que o probiótico com células viáveis produziu níveis mais altos de IgA no soro sanguíneo e maiores níveis de IgA encontrada nos linfonodos mesentéricos que no tratamento com células inativadas ou no controle. Este resultado sugere que o probiótico com bactérias viáveis é mais eficiente que o probiótico inativado para induzir imunoestimulação e modificações intestinais nos leitões.

Savilahti, Kuitunen e Vaarala (2008) citam aumentos de IgA fecal após tratamento com probiótico. A secreção de IgA pode ser regulada pela presença de antígenos bacterianos no intestino e é importante na imunidade de mucosa

porque inibe o ataque e a penetração de bactérias e toxinas no lúmen intestinal (MAKAY; PERDUE, 1993).

Para as imunoglobulinas G (IgG) (Tabela 6), não houve efeito ($P>0,05$), provavelmente devido à falta de desafio aos animais. Porém, verificou-se um aumento no *status* imunitário, com o avançar da idade dos animais, para as dietas controle, com prebiótico e com antibiótico. No entanto, não houve esse mesmo comportamento para controle mais probiótico. Esses resultados são esperados com o desenvolvimento natural do sistema imunológico, esperado realmente em todos os animais. Valores para imunoglobulinas M (IgM) não foram diferentes ($P>0,05$).

O uso de mananoliogossacarídeos e Zn quelatado foi testado por Castilho et al. (2008) para leitões na fase de creche e não foram encontradas diferenças entre as dietas para imunoglobulinas IgA, IgG e IgM.

Respostas semelhantes foram obtidas por Ganner et al. (2009), utilizando frações de parede celular de leveduras na imunidade de leitões. Nesta pesquisa com apenas dois grupos de animais, aos sete dias, não houve diferença para ambos os grupos. Porém, aos 21 dias, houve aumento na resposta de imunoglobulinas no grupo que recebeu mananoligossacarídeo na dieta.

O prebiótico mananoligossacarídeo é tido, por alguns autores (FERKET, 2002, 2003; SAVAGE; COTTER; ZAKRZEWSKA, 1996), como estimulador do sistema imune humoral, gerando economia de nutrientes (energia e proteína) por não causar estímulo crônico do sistema ativo de defesa, muito mais dispendioso.

A resposta imunitária branda para leitões na fase de creche é positiva para ativação do sistema imune. Caso essa ativação seja aguda, poderia ser prejudicial ao desempenho dos animais.

Cheeson (1994) identificou fatores que podem ocorrer na alteração da microbiota intestinal em suínos, incluindo um aumento na proporção do “pool”

de aminoácidos disponível para outros tecidos, redução de nitrogênio endógeno e um aumento correspondente em digestibilidade aparente de nitrogênio e absorção.

De acordo com Resta (2009), várias pesquisas apontam bactérias probióticas como melhoradoras da saúde intestinal, em que suínos, principalmente leitões, têm mostrado melhora na microbiota intestinal, contribuindo para o aumento na disponibilidade de nutrientes, vitaminas, ácidos graxos de cadeia curta ou aminoácidos. Outro aspecto importante é a proteção direta e indireta contra patógenos por estímulo dos sistema imune (BAILEY, 2009).

4 CONCLUSÕES

Não foram encontradas respostas positivas para desempenho com uso de prebióticos, probióticos e antibióticos, para leitões, no período de 22 a 54 dias de idade.

Prebióticos e probióticos não promoveram alteração na consistência fecal dos leitões na fase de creche.

Os animais não apresentaram respostas imunológicas que possam ser atribuídas ao uso de prebióticos, probióticos e antibióticos.

Prebióticos e probióticos podem ter proporcionado maior número de leucócitos, aos 54 dias de idade.

Prebióticos influenciaram o número de eosinófilos aos 36 dias, para leitões na fase de creche.

REFERÊNCIAS

BAILEY, M. The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 33, n. 3, p. 375-383, Mar. 2009.

BROWN, C.; BAKER, D. C.; BARKER, I. K. Alimentary system. In: MAXIE, M. G. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 293-296.

CASTILHO, M. et al. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 94-101, Oct. 2008.

CHEESON, A. Probiotics and other intestinal mediators. In: COLE, D. J. A.; WISEMAN, J.; VARLEY, M. A. (Ed.). **Principles of pigs science**. Nottingham: University of Nottingham, 1994. p. 197-214.

CHIQUIERI, J. et al. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 97-104, 2007.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

ESTIENNE, M. J.; HARTSOCK, T. G.; HARPER, A. F. Effects of antibiotics and probiotics on suckling pig and weaned pig performance. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Davis, v. 3, n. 4, p. 303-308, 2005.

FEDALTO, L. M.; TKACZ, M.; ADER, L. P. Probióticos na alimentação de leitões do desmame ao 63 dias de idade. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 83-88, 2002.

FELDMAN, B. F. et al. **Veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1986. 1619 p.

FERKET, P. R. Manutenção da saúde intestinal em um mundo sem antibióticos. In: RONDA LATINOAMERICANA DA ALLTECH, 13., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2003. p. 26-39.

_____. Use of oligosaccharide and gut modifiers as replacements for dietary antibiotics. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 63., 2002, Indianápolis. **Proceedings...** Indianápolis: North Carolina State University, 2002. p. 169-186.

GANNER, A. et al. Effect of yeast cell wall fractions on innate and adaptive immunity of weaning piglets. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DE LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: CNBA, 2009. p. 155-156.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. 417 p.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2007. 729 p.

KONSTANTINOV, S. R. et al. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 599-607, Dec. 2008.

LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. **Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology**. Iowa: Iowa State, 2003. 448 p.

LESSARD, M. et al. Administration of *Lactobacillus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 3, p. 922-935, Mar. 2009.

LILLIEHÖÖK, I.; TVEDTEN, H. Investigation of hypereosinophilia and potential treatments. **Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 1359-1378, Dec. 2003.

MAKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 38, n. 9, p. 1735-1745, Sept. 1993.

MIKKELSEN, L. L.; JAKOBSEN, M.; JENSEN, B. B. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of pigs post-weaning. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 109, n. 6, p. 144-150, 2003.

MORAIS, K. M. C. M. T. et al. Probióticos para leitões lactentes na fase de creche. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 519-527, dez. 2010.

MORAN, C.; VEIGA, A. Mananas: a estrutura define sua função e com a glicômica atua na resistência a doenças. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DE LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: CNBA, 2009. p. 91-98.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of swine**. Washington: National Academy, 1998. 189 p.

NOFRARIAS, M. et al. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2735-2742, Oct. 2006.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A. P. R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. (Ed.). **Probiotics 3: immunodulation by the gut microflora and probiotics**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 213-233.

PETTIGREW, J. E. Bio-Mos effects on pig performance: a review. In: BIOTECHNOLOGY IN FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 16., 2000, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2000. p. 31-34.

RESTA, S. C. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. **Journal of Physiology**, London, v. 587, p. 4169-4174, Sept. 2009.

RODRIGUES, M. A. M. et al. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morphology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 6, p. 241-245, dez. 2007.

SAAD, S. M. I. Prebióticos e probióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./fev. 2006.

SANCHES, A. L. et al. Utilização de probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 774-777, jul./ago. 2006.

SANTOS, W. G. et al. Manose na alimentação de leitões na fase de creche: desempenho, pH do trato gastrintestinal e peso de órgãos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 696-702, maio/jun. 2003.

SAVAGE, T. F.; COTTER, P. F.; ZAKRZEWSKA, E. I. The effect of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgG of Wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 43-145, 1996. Supplement.

SAVILAHTI, E.; KUITUNEN, M.; VAARALA, O. Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, London, v. 8, n. 3, p. 243-248, June 2008.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983-990, nov./dez. 2003.

SPRING, P.; PRIVULESCU, M. Mannan oligosaccharide: its logical role as natural feed additive for piglets. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY ANNUAL SYMPOSIUM, 13., 1998, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 1998. p. 553.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **System for Microsoft Windows**. Version 8.2. Cary, 2001. Software.

TARAS, D.; VAHJEN, M. M.; SIMON, O. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. **Journal of Animal Science**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 608-617, Mar. 2006.

_____. Probiotics in pigs: modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 108, n. 1/3, p. 229-223, May 2007.

UTIYAMA, C. A. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarréia e o desempenho de leitões recém desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, nov./dez. 2006.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. 377 p.

CAPÍTULO III

**COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE LEITÕES DE 6 A
25 kg**

Santos, A.V.; Lima, J. A.F.; et al.

RESUMO

Avaliou-se a composição da microbiota intestinal de leitões na fase de creche, utilizando nas dietas aditivos prebióticos, probióticos e antibióticos. Foram utilizados 80 leitões com idade de 22 dias, sendo 40 machos e 40 fêmeas, com peso inicial de $7,1 \pm 0,075$ kg. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo: 1 - controle; 2 - prebiótico (mananoligossacarídeo); probiótico (*Bacillus subtilis* 30g/tonelada) e antibiótico (bacitracina de zinco 125g/tonelada). Foi abatido um animal por parcela, aos 29, 36 e 54 dias de idade. Três repetições de cada tratamento foram unidas, formando um *pool*. Foram utilizadas 24 amostras, sendo 12 da região do íleo e 12 da região do ceco. A extração foi iniciada a partir de 1 g de cada *pool*. Para a caracterização da microbiota intestinal, utilizaram-se a reação de cadeia da polimerase (PCR) e a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Em seguida, foi realizado o sequenciamento dos microrganismos. Os microrganismos existentes, para duas regiões intestinais avaliadas, no íleo, foram: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Prevotella* sp., c) *Selenomonas noxia*, d) *Mycobacterium vanbaalenii*, e) *Uncultured bacterium*, f) *Ostreococcus lucimarinus*, g) *Escherichia coli*, h) *Agrobacterium tumefaciens*, i) *Uncultured bacterium*, j) *Bacteroidetes bacterium*, k) *Methanobrevibacter ruminantium*, l) *Geobacter bemidjensis*. No ceco foram identificadas: a) *Burkholderia xenovorans*, b) *Pseudomonas fluorescens*, c) *Lactobacillus rhamnosus*, d) *Streptococcus suis*, e) *Stenotrophomonas maltophilia*, f) *Eubacterium minutum*, g) *Enterobacter hormaechei*, h) *Clostridium* sp. e i) *Uncultured bacterium*. As bactérias identificadas apresentaram-se distintas de acordo com a região intestinal pesquisada.

Palavras-chave: Prebióticos. Probióticos. Antibióticos. Microbiota intestinal. Leitões

ABSTRACT

The composition of piglets intestinal microbiota in the post-weaning phase, using in the diets additives prebiotics, probiotics and antibiotics was evaluated. 80 piglets aged 22 days, namely, 40 males and 40 females, initial weight of 7.1 ± 0.075 kg were utilized. The utilized design was randomized blocks with four treatments and five replicates: 1 - Control 2 - prebiotic (mannanoligosaccharide MOS) Probiotic (*Bacillus subtilis* 30g/ton) and antibiotic (Bacitracin Zinc 125g/ton). One animal per plot was slaughtered at 29, 36 and 54 days old. Three replicates of each treatment were joined together, making up a pool. 24 samples were used; namely, 12 of the 12 region of the ileum and 12 of the region of the cecum. The extraction was started from a gram of each pool. For the characterization of the intestinal microbiota, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Gel Electrophoresis Denaturing Gradient (DGGE) were used; next, the sequencing of micro-organisms was performed. The existing micro-organisms for two intestinal regions assessed; in the ileum were: a-*Pseudomonas aeruginosa*; b-*Prevotella sp.* c-*Selenomonas noxia*, d-*Mycobacterium vanbaalenii*, e-uncultured bacterium, f-*Ostreococcus lucimarinus*, g-*Escherichia coli*; h-*Agrobacterium tumefaciens*, i-uncultured bacterium, j-*Bacteroidetes bacterium*, k-*Methanobrevibacter ruminantium*, l-*Geobacter bemidjensis*, in the cecum were identified: a-*Burkholderia xenovorans* b-*Pseudomonas fluorescens*, c-*Lactobacillus rhamnosus* d-*Streptococcus suis*, e-*Stenotrophomonas maltophilia*, f-*Eubacterium minutum*; g-*Enterobacter hormaechei*, h-*Clostridium sp.* i-uncultured bacterium. The identified bacteria presented themselves distinct according to the intestinal region investigated.

Keywords: Prebiotics. Probiotics. Antibiotics. Intestinal microbiota. Piglets

1 INTRODUÇÃO

Várias alternativas têm sido propostas, nas últimas décadas, no intuito de diminuir ou, até mesmo, substituir os antibióticos das rações. Entre eles, destaca-se o uso de prebióticos e os probióticos como promotores do crescimento. Entretanto, com as técnicas tradicionais de cultivo, se conhecem apenas 10% dos microrganismos presentes na flora intestinal dos suínos.

Nas últimas duas décadas, o uso de técnicas moleculares, que não dependem de cultivo bacteriano, têm contribuído para a identificação desses microrganismos, possibilitando, assim, a identificação de bactérias e, possivelmente, a aquisição de tratamentos mais eficazes. Porém, a composição da microbiota intestinal de suínos é altamente complexa e colonizada por uma maioria de microrganismos que não são cultiváveis (KRAUSE; GASKINS; MACHIE, 2006).

A técnica da DGGE apresenta como principal vantagem sobre outras técnicas que analisam o polimorfismo a reprodutividade. É uma metodologia que pode fornecer informações sobre a dinâmica e a complexidade da comunidade de bactérias em estudo, sendo uma estratégia interessante para avaliar a riqueza de microrganismos que compõem a flora intestinal animal.

O DGGE é uma técnica de fácil obtenção de géis, de baixo custo e não é necessário usar iniciador com grampo GC. Suas limitações são a necessidade de otimização das reações e os riscos de ocorrer reanelamento de sequências homólogas em fitas de DNA diferentes, o que possibilita subestimar a diversidade de microrganismos (XAVIER, 2004).

Embora não existam relatos, na literatura, que caracterizem os microrganismos, no nível molecular, presentes nas regiões do íleo e do ceco de leitões na fase de creche, esta pesquisa é uma das primeiras a realizar a caracterização dessa microbiota utilizando utilizando o DGGE e, em seguida, o

sequenciamento. Os achados na literatura identificam apenas o perfil desses microrganismos de forma generalizada (PEDROSO et al., 2005).

Técnicas de biologia molecular têm sido empregadas na caracterização de microbiotas (CURY, 2002). A amplificação da região rDNA 16s pela PCR (*Polymerase chain reaction*) e a eletroforese em gel de acrilamida na presença de um gradiente de desnaturação (DGGE) são exemplos dessas técnicas. A DGGE é uma técnica caracterizada pela amplificação da região rDNA 16s, podendo ou não conter sequências distintas que são separadas pela eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, obtendo-se um perfil genotípico dessa comunidade.

Metabólitos da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de estimular positivamente diversas comunidades bacterianas do trato gastrointestinal de suínos (PRICE et al., 2010) e inibir o crescimento de *Escherichia Coli* e *Candida tropicalis* (JENSEN; PATTERSON; YOON, 2008).

Com o uso de técnicas moleculares, como PCR e DGGE, pode-se, de forma rápida, identificar a flora e estudar as infecções ecológicas microbianas, permitindo, assim, um controle mais eficaz de possíveis danos à saúde dos animais.

Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito de aditivos na composição da microbiota intestinal de leitões alimentados com prebióticos, probióticos e antibióticos, na fase de creche, utilizando as técnicas de PCR e DGGE.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, instalações e animais

O experimento foi realizado no centro experimental de suínos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

O experimento foi conduzido no galpão de creche, em 20 baias suspensas (2,0 x 1,5m), sendo o piso de concreto armado, totalmente ripado, equipadas com comedouros semiautomáticos e bebedouro tipo “chupeta”. Antes de alojar os animais, realizaram-se a limpeza e a desinfecção da creche. Esta limpeza foi realizada com lavagem dos comedouros com água e sabão. As baias foram lavadas com água corrente e, em seguida, aplicada cal hidratada nas paredes e no piso, permanecendo vazias por um período de sete dias. Neste ambiente de experimento, foram observadas as temperaturas mínima e máxima diariamente, por meio de termômetro colocado na parte mediana da instalação. A ração e a água foram fornecidas à vontade.

Foram utilizados 80 leitões (Danbred X Agroceres) oriundos de uma granja comercial da região sul de Minas Gerais, próxima à Universidade Federal de Lavras, que possui bom status sanitário. Os animais foram pesados individualmente, identificados por meio de brincos e distribuídos em cinco blocos, em função do peso, totalizando 80 animais. A baia, que representou a unidade experimental, foi composta por quatro animais, sendo dois machos e duas fêmeas.

2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 machos e 40 fêmeas, desmamados aos 22 dias de idade, com peso inicial de $7,1 \pm 0,017$ kg. O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, sendo quatro tratamentos (1 - controle, 2 - prebiótico, 3 - probiótico e 4 - antibiótico) e cinco repetições. Os animais foram pesados individualmente e distribuídos em cinco blocos, em função do peso. A baía representou a parcela experimental, composta por quatro animais, sendo dois machos e duas fêmeas.

2.3 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, óleo e núcleo comercial, suplementadas com vitaminas, minerais, aminoácidos e ausente de antibióticos, de forma a atender às exigências nutricionais dos leitões durante o período de creche, ou seja, dos 22 aos 60 dias de idade, segundo a National Research Council - NRC (1998). A composição das dietas experimentais é apresentada na Tabela 1.

As dietas foram: 1 - dieta basal, 2 - dieta basal + prebiótico 0,2% (mananoligossacarídeo), 3 - dieta basal + probiótico (*Bacillus subtilis* 30g/tonelada) e 4 - dieta basal + antibiótico (bacitracina de zinco 125 g/tonelada).

A composição, em microrganismos, do probiótico (*Bacillus subtilis*) adicionado às dietas dos leitões e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de produto (Calsporin®) foram de 1×10^{10} UFC/g.

Tabela 1 Composição das dietas experimentais

Ingrediente (%)	Dietas	
	Pré-inicial	Inicial
Milho moído	35,00	44,50
Farelo de soja	20,00	29,00
Açúcar	3,00	3,00
Óleo de soja	2,00	1,50
Núcleo pré-inicial leitões	40,00	20,00
Núcleo inicial	-	2,00
Total	100,00	100,00
Níveis nutricionais		
PB (%)	20,00	21,13
EM kcal/kg	3.560	3.428
Cálcio (%)	0,60	0,69
Fósforo disponível (%)	0,50	0,46
Lisina digestível	1,282	1,226
Met+ Cis digestível	0,779	0,711
Treonina digestível	0,850	0,804
Triptofano digestível	0,271	0,258

Núcleo pré-inicial – Composição: soro de leite em pó desnatado, leite em pó integral, leite desnatado em pó, colina, soja extrusada, milho pré-gelatinizado, açúcar, ácido fumárico, óleo vegetal, fosfato bicalcico, treonina, triptofano, calcário calcítico, premix mineral, L-lisina, premix vitamínico, cloreto de sódio, DL-metionina, hidróxido de tolueno butilato (B.H.T.) – Níveis por kg de produto: Vitamina A (360.000U.I.), Vitamina D3 (7.500 U.I), Vitamina E (450 mg), Vitamina K3 (18 mg), Tiamina (12 mg), Riboflavina (29,5 mg), Piridoxina (13,5 mg), Vitamina B12 (0,01 mg), Niacina (118 mg), Ácido pantotênico (47,5 mg), Ácido fólico (3,25 mg), Biotina (0,75 mg), Vitamina C (300 mg), Colina (1.500 mg), B.H.T. (300 mg), Ferro (875 mg), Cobre (625 mg), Manganês (180 mg), Zinco (625 mg), Cobalto (3,25 mg), Selênio (1 mg).

Núcleo Inicial – Composição: ácido fólico, ácido pantotênico, bitotina, calcário calcítico, caulín, cloreto de colina, cloreto de sódio, fosfato bicálcico, aditivo antioxidante (B.H.T.), iodato de cálcio, niacina, óxido de zinco, vitamina B6, vitamina B2, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato de ferro, vitamina B1, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3. Níveis por kg do produto: ácido fólico (39 mg), ácido pantotênico (625 mg), B.H.T. (1.500), biotina (8 mg), cálcio (145 mg), cobalto (10 mg), cobre (4.375 mg), colina (9.000 mg), ferro (2.780 mg), fósforo (41 mg), iodo (45 mg), manganês (1.360 mg), niacina (1.250 mg), selênio (13 mg), sódio (41 g), vitamina A (380.000U.I), vitamina B1 (60 mg), vitamina B12 (940 mcg), vitamina B2 (310 mg), vitamina B6 (80 mg), vitamina C (1250 mg), vitamina D3 (60.000 U.I), vitamina E (1.250 mg), vitamina K3 (125 mg), zinco (3.750 mg).

2.4 Procedimentos experimentais

As dietas foram fornecidas à vontade aos leitões a partir dos 22 dias de idade. A água foi fornecida à vontade, durante todo o período experimental.

Após jejum de 8 horas, realizou-se a eutanásia de um animal por parcela, aos 29, 36 e 54 dias de idade, para a coleta das amostras de sangue. Os procedimentos de abate dos animais para coleta das amostras seguiram as recomendações aprovadas pelo comitê de ética da Universidade Federal de Lavras, Protocolo nº 018/2010. No momento do abate, os animais foram insensibilizados e procedeu-se à sangria, na veia jugular.

2.4.1 Mensurações microbiológicas

Amostras da região do íleo e ceco proximal foram obtidas retirando-se cerca de 5 cm do íleo distal e 5 centímetros do ceco proximal, sendo isoladas, identificadas e, posteriormente, em capela de fluxo laminar, foi feita raspagem do conteúdo do íleo e do ceco com uso de bisturi e lâminas estéreis. O conteúdo da mucosa do íleo e do ceco foi armazenado em microtubos, identificado e congelado, a -20°C. Posteriormente, foram realizadas extração do DNA para as análises por PCR e DGGE das amostras.

Três repetições de cada tratamento foram unidas, formando um *pool*. Foram utilizadas 24 amostras, sendo 12 da região do íleo e 12 para a região do ceco. A extração foi iniciada a partir de 1 g de cada *pool*, centrifugado por 3 minutos, a 13.000 x g, o sobrenadante foi coletado e submetido à extração do DNA, utilizando-se o *kit* comercial QIAamp® (Quiagen, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA genômico foi resuspenso em água deionizada esterilizada e armazenado a -20°C, até as análises. Por ocasião das análises, foi feita uma composição equitativa das amostras. Os procedimentos de

DGGE foram, então, realizados nas 24 amostras compostas do conteúdo ileal e cecal dos tratamentos em cada período de coleta.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), a amplificação dos fragmentos específicos da região V3 do rDNA 16S dos microrganismos do domínio *Bacteria* foi mediante um par de *primer*: BA338f (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GCA GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG GGG AGG CAG CAG 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (OVREAS et al., 1997), em solução com volume total de 50 µl, contendo 0,2 µM de cada *primer*, 0,5U de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega®), 5 µl do tampão da reação 10X com 20 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs Mix (Promega®) e 40 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em tubos de 0,2 mL, utilizando um termociclador (Modelo PCYL220, Thermo Fisher ScientiWc Inc., Waltham, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial, durante 4 minutos, a 94°C; 35 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos; anelamento, a 54°C, por 1 minuto; extensão, a 72°C, durante 1 minuto e extensão final, a 72°C, durante 5 minutos.

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com gradiente desnaturante variando de 15% a 55%, para a região ileal e 25% a 45%, para a região cecal. O gradiente foi preparado utilizando-se poliacrilamida contendo 0-100% de desnaturante (uréia 7M e 40% de formamida). A DGGE foi realizada com auxílio do equipamento DCode (BioRad Universal DCode Sistema de Detecção de Mutação, EUA) em géis e tampão TAE 0,5X (20 mM Tris acetato e 0,5 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 130V e temperatura constante de 60°C, durante 6 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com *Syber-Green*, por 30 minutos e analisados e fotografados em um transiluminador UV (L-Pix, Loccus Biotecnologia).

Uma alíquota dos produtos de PCR (amplicons) foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% - 0,5X TBE, utilizando-se um densitômetro laser e o programa *Fragment Analyses* (Molecular Dynamics), e quantificada usando-se um padrão molecular.

A similaridade da composição das comunidades microbianas nos diferentes tratamentos e períodos foi determinada com base na presença ou na ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database para a determinação da riqueza de amplicons (Sa). Utilizando-se o algoritmo de *Ward* e a distância euclidiana como unidade de medida, o agrupamento hierárquico foi realizado por meio do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (*simple matching*).

Após realizadas as DGGE, as mesmas foram fotografadas e as bandas de DNA foram, então, cortadas; foi realizada a PCR e, em seguida, foram sequenciadas e, então, identificada a similaridade de cada bactéria presente nas respectivas amostras.

2.4.2 Sequenciamento

Os insertos de DNA, extraídos do gel, foram sequenciados em aparelho sequenciador de DNA, Mega Bace 1000 (AMERSHAM BIOSCIENCES). Para o sequenciamento, foi utilizado o método enzimático baseado na síntese de DNA *in vitro* na presença de nucleosídeos trifosfatados terminadores de cadeia (SANGER; NICKLEN; CHASE, 1987).

Os DNAs purificados foram amplificados por PCR na presença de DNA polimerase, de um *primer* específico (338f) CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG(518r) ATT ACC GCG GCT GCT GG), de desoxirribonucleotídeos

trifosfatados (dNTPs) em excesso e de uma pequena quantidade de didesoxirribonucleosídeos trifosfatos terminadores de cadeia (ddNTPs), marcados com substância fluorescente (diclororhodamina ligada à fluoresceína). Quando dNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP) não apresentam o grupo 3'-OH da desoxirribose presente em nucleotídeos normais, eles são aleatoriamente incorporados na cadeia de DNA que está sendo sintetizada. A adição do nucleosídeo seguinte é bloqueada. Dessa forma, a reação enzimática gera fragmentos de DNA marcados com substância fluorescente, os quais são posteriormente separados por eletroforese e detectados, permitindo a determinação da sequência completa da fita molde de DNA. O sequenciamento foi realizado com o *kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento, foram adicionados a uma microplaca para PCR contendo 96 cavidades, 1 µl de cada amostra de DNA e 4 µl de *Big Dye Terminator* (DNA polimerase/dNTPs/ddNTPs) diluído [4X] no tampão de sequenciamento (Tris-HCl 50 mmol.L-1 e cloreto de magnésio 1,25 mmol.L-1), acrescido de 5 picomoles de *primer forward*. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler gradient, utilizando-se o seguinte programa: 30 ciclos de 95°C, por 20 segundos, 50°C, por 15 segundos e 60°C, durante 1 minuto.

Os produtos amplificados da reação de sequenciamento foram precipitados, adicionando-se 1 µl de acetato de amônio 7,5 mol.L-1 às amostras em cada cavidade da microplaca de PCR. Em seguida, adicionaram-se duas vezes o volume com etanol 95%. Posteriormente, as placas foram vedadas com adesivo, agitadas manualmente por inversão, permanecendo à temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação, por 45 minutos, a 4.000 x g, a 20°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados com 100 µl de etanol 70%. As placas foram centrifugadas, por 15 minutos, a 4.000 x g, a 20°C. Os sobrenadantes foram descartados e as microplacas foram novamente centrifugadas de forma invertida sobre papel absorvente (1.000 xg, 1

min) para remover o excesso de etanol, sendo, em seguida, mantidas a 37°C, por 10 minutos, para secagem.

Após adicionar 10 µl de *loading solution* em cada poço da microplaca, essa foi injetada no Mega Bace 1000. Os parâmetros de eletroforese utilizados foram: voltagem de injeção: 3 Kv; tempo de injeção: 83 segundos; voltagem de corrida: 6 Kv e tempo de corrida: 240 minutos. As sequências foram determinadas utilizando-se o programa Sequence Analyzer.

As sequências foram identificadas utilizando-se o interno espaçador transcrito (ITS) ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE et al., 1990). O sequenciamento de porções do 16S de bactérias para a região 16S foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) na UFLA. A similaridade de sequência foi realizada utilizando-se o algoritmo BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2010).

2.4.3 Dendrograma de similaridade

O alinhamento das sequências foi feito com utilização do programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) com os parâmetros padrões *default*, utilizando-se as sequências de nucleotídeos. As sequências foram visualmente inspecionadas e manualmente corrigidas, sendo removidos segmentos cuja homologia não pode ser acertada. A árvore final foi feita utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), com o modelo de comparação *Neighbor-joining* (SAITU; NEI, 1987), método de distância *p* e supressão *pair-wise*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão relacionados os microrganismos presentes na região ileal e cecal do intestino de leitões na fase de creche.

Tabela 2 Microrganismos presentes na região ileal e cecal de suínos na fase de creche.

Região	Homologia	Acesso	Identidade	E value
ÍLEO	<i>Prevotella</i> sp.	GU409537.1	19%	0,004
	<i>Selenomonas noxia</i>	GU402467.1	37%	5,2
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	CP000511.1	91%	1,9
	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	CP000587.1	25%	4,6
	<i>Escherichia coli</i>	GU415854.1	38%	6×10^{-4}
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AE007870.2	99%	0,0
	Bactéria não cultivada	GU003349.1	24%	0,18
	<i>Bacteroidetes bacterium</i>	DQ112662.1	21%	1,9
	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	CP001719.1	24%	3,3
	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	CP001124.1	19%	4,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF147449.2	28%	1,9	
CECO	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CP000076.1	96%	4,5
	<i>Streptococcus suis</i>	CP000837.1	48%	0,19
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	GU419613.1	76%	0,026
	<i>Burkholderia xenovorans</i>	CP000270.1	43%	7,1
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	AF375918.1	37%	0,50
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AM743169.1	25%	4,4
	<i>Eubacterium minutum</i>	GU420954.1	45%	7×10^{-7}
	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	CP000267.1	64%	2,8
	<i>Clostridium</i> sp.	AB539902.1	36%	0,046
Bactéria não cultivada	EU456373.1	38%	2×10^{-15}	
NCBI	<i>Bacillus subtilis</i>	FR773878	-	-

Sequências identificadas nas regiões íleal e cecal de leitões na fase de creche dos 22 aos 54 dias de idade. Homologia: sequências homólogas a sequências de microrganismos depositadas no banco de dados do NCBI (2010). Acesso: número de acesso às sequências homólogas no NCBI, Identidade: Identidade em porcentagem com as sequências do NCBI e E-value: valor da identidade com as sequências do banco de dados.

As informações da Tabela 2 são provenientes do sequenciamento da região V3 do rDNA 16S dos microrganismos presentes na região ileal e cecal

dos leitões na fase de creche. Muitas bactérias são de vida livre, outras são oportunistas ou foram encontradas em ingredientes das rações, como milho e farelo de soja, utilizadas em transgenia de plantas, como a *Agrobacterium tumefaciens*.

O *Bacillus subtilis* foi utilizado como microrganismo de referência, pois o mesmo já foi utilizado no experimento como probiótico, porém, acredita-se que a sua ausência nas amostras sequenciadas pode estar relacionadas a fatores, como as amostras de DNA se degradaram, por não estarem com boa qualidade e os *primers* exclusivos para *Bacillus Subtilis* não foram amplificados e, embora distantes na similaridade, alguns fragmentos de DNA são compatíveis com *Bacillus*.

A composição dos microrganismos variou em função da região analisada. A maior variabilidade entre microrganismos do trato intestinal de suínos ocorre em função do local de amostragem e não do tratamento administrado (PEDROSO et al., 2005).

As sequências de DNA da região ileal e cecal dos microrganismos encontrados foram depositadas no banco de dados do NCBI.

O dendograma de similaridade relacionando as sequências gênicas dos microrganismos identificados nas regiões ileal e cecal de leitões na fase de creche e depositadas no NCBI pode ser visto na Figura 1.

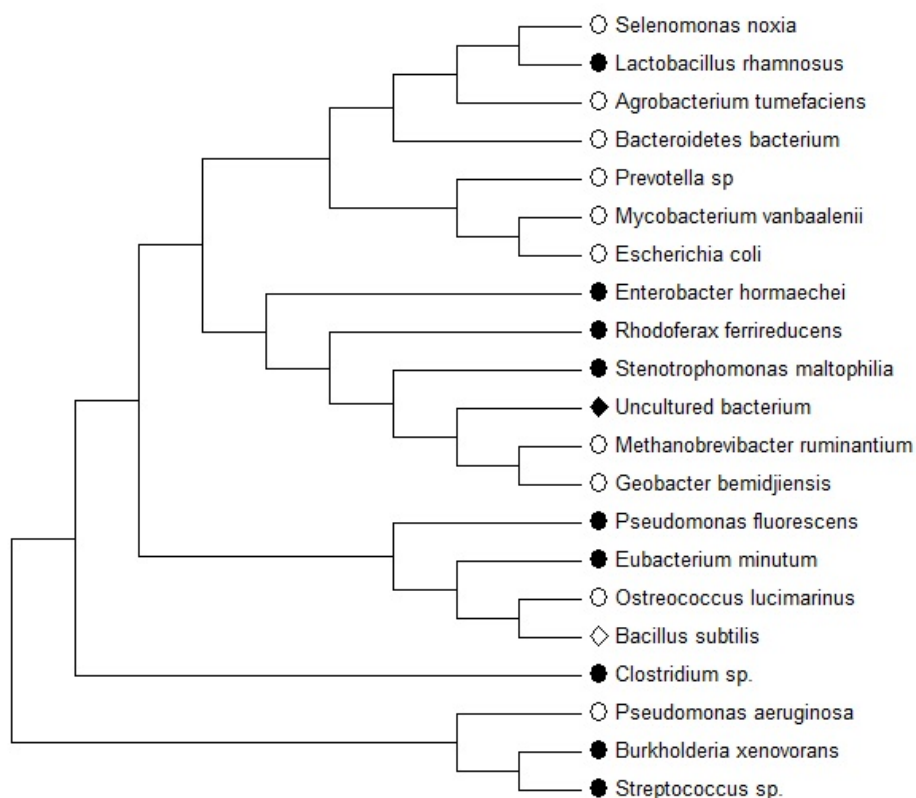


Figura 1 Dendrograma de similaridade relacionando sequências gênicas de microrganismos depositadas no NCBI homólogas as regiões íleal (○) e cecal (●). A sequência obtida no NCBI – *Bacillus subtilis* está representada por (◇). Valores de *bootstrap* menores que 50% foram omitidos.

É possível observar que, no dendrograma, os microrganismos identificados foram subdivididos em quatro grupos, de acordo com sua similaridade. O primeiro grupo, representado basicamente por bactérias encontradas no íleo (*Selenomonas noxia*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteróides bacterium*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Prevotell sp.* e *Escherichia coli*). A exceção foi para *Lactobacillus rhamnosus* presente no ceco; no segundo grupo, a maior similaridade ficou entre *Enterobacfter hormaechei*, *Rhodoferrax*

ferrireducens, *Stenotrophomonas multophilia* e bactéria não cultivada; no terceiro grupo, a similaridade ficou entre *Pseudomonas fluorescens* e *Eubacterium minutum* localizadas no ceco e *Ostreococcus lucimarinus*, no íleo, os três micro-organismos com maior similaridade em relação ao probiótico utilizado, o *Bacillus subtilis*. *Clostridium* sp. ficou isolado e mais distante dos demais e, por último, *Pseudomonas aureoginosa*, no íleo e *Burkholderia xenovorans*, *Streptococcus* sp., no ceco.

Apesar de serem microrganismos distintos, de acordo com a região amostrada, as bactérias apresentaram relações próximas, quando subdivididas nos quatro grupos.

Foi identificada a presença da *Escherichia coli* no íleo (Figura 2 e 3). Essa é a bactéria de maior importância, devido aos danos que a mesma pode gerar no ambiente intestinal dos leitões, desde diarreias, inapetência, podendo culminar na morte dos animais. Porém, nesta pesquisa, não foi possível encontrar um quadro diarréico ou outros problemas de saúde animal que possam ser atribuídos a este microrganismo. *Escherichia coli* é uma bactéria comum da flora intestinal.

Portanto, considerando a homologia e a presença da *Escherichia coli* (Figura 5 e 6), a não apresentação de um quadro diarréico nos leitões, sugere-se que a variedade encontrada não é enteropatogênica.

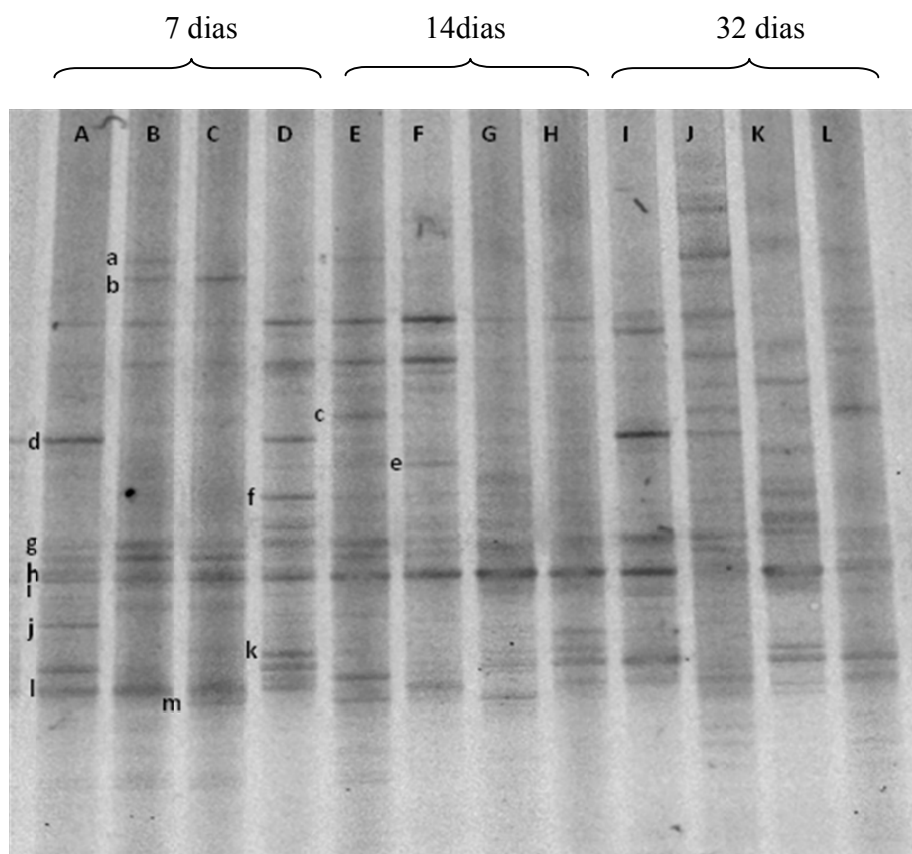


Figura 2 DGGGE de 12 amostras da região ileal de suínos dos 22 aos 54 dias de idade, com gradiente desnaturante de 15% e 55%.

A = Controle 7 dias, B= probiótico 7 dias, C = probiótico 7 dias, D = antibiótico 7 dias, E = Controle 14 dias, F = probiótico 14 dias, G = probiótico 14 dias, H = antibiótico 14 dias, I = Controle 32 dias, J = probiótico 32 dias, K = probiótico 32 dias, L = antibiótico 32 dias.

a- *Pseudomonas aeruginosa* AF029673.2; b-*Prevotella* sp. GU409537.1; c-*Selenomonas noxia* GU402467.1; d- *Mycobacterium vanbaalenii* CP000511.1; e-*Uncultured bacterium* FJ832853.1; f- *Ostreococcus lucimarinus* CP000587.1; g-*Escherichia coli* GU415854.1; h-*Agrobacterium tumefaciens* AE007870.2; i- *Uncultured bacterium* GU003349.1; j-*Bacteroidetes bacterium* DQ112662.1; k-*Methanobrevibacter ruminantium* CP001719.1; l- *Geobacter bemidjensis* CP001124.1; m- *Pseudomonas aeruginosa*.

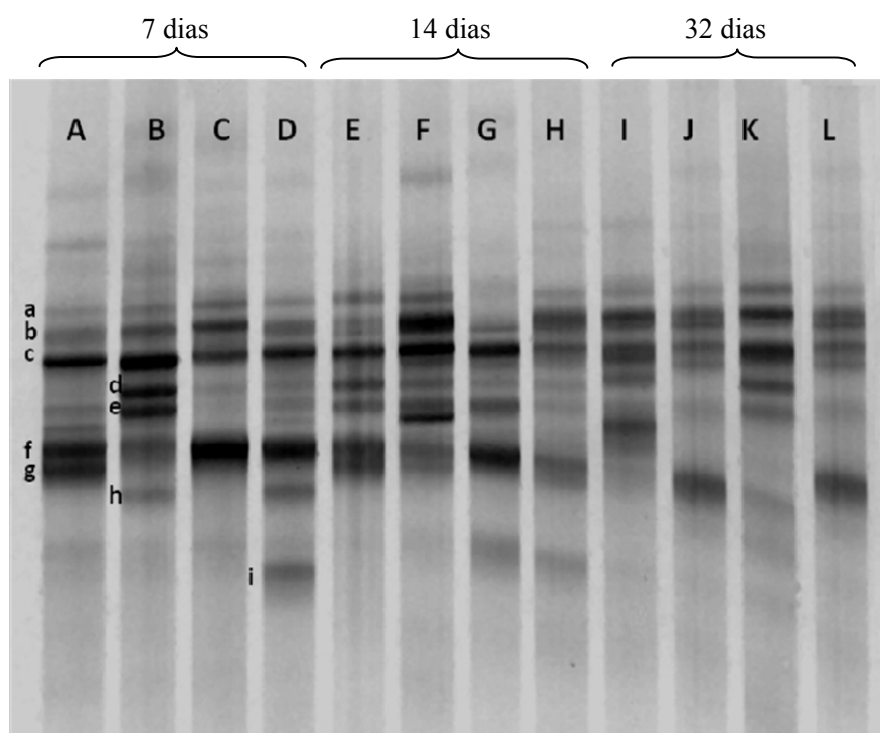


Figura 3 DGGE de 12 amostras da região cecal de suínos dos 22 aos 54 dias de idade, com gradiente desnaturante de 25% e 45%.

A = Controle 7 dias, B= prebiótico 7 dias, C= probiótico 7 dias, D= antibiótico 7 dias, E= Controle 14 dias, F= prebiótico 14 dias, G= probiótico 14 dias, H= antibiótico 14 dias, I= Controle 32 dias, J= prebiótico 32 dias, K= probiótico 32 dias, L= antibiótico 32 dias.

a-*Burkholderia xenovorans* CP000270.1; b-*Pseudomonas fluorescens* CP000076.1; c-*Lactobacillus rhamnosus* AF375918.1; d-*Streptococcus suis* CP000837.1; e-*Stenotrophomonas maltophilia* AM743169.1; f-*Eubacterium minutum* GU420954.1; g-*Enterobacter hormaechei* GU419613.1; h- *Clostridium sp.* AB539902.1; i- *Uncultured bacterium*

De acordo com os resultados obtidos para as duas regiões intestinais analisadas nos suínos, os microrganismos identificados foram bastante diferentes entre as duas regiões, concordando com Mackie, Sghir e Gaskins (1999). Sugere-se que leitões possam conviver com a *Escherichia coli* sem que haja prejuízos para o desempenho animal, desde que sejam cepas não patogênicas. Entretanto, o uso de prebióticos, probióticos e suas combinações pode favorecer positivamente a saúde intestinal de leitões.

Agrobacterium tumefaciens (Figura 2) foi um microrganismo observado em todas as dietas na região ileal, porém, esta bactéria está relacionada com o processo de aquisição de alimentos transgênicos, empregados na soja e no milho, que são utilizados nas rações.

De acordo com a Figura 2, a *Mycobacterium vanbaalenii* esteve presente em todas as dietas controle, exceto no período de 14 dias de experimento, indicando, assim, uma possível ação do prebiótico e do probiótico na sua eliminação nas demais dietas. A *Escherichia coli* esteve presente em todas as amostras.

Ainda no íleo, a presença de *Bacteroides bacterium* ocorreu aos 7 dias de experimento no tratamento controle, não sendo encontrada nos períodos subsequentes, possivelmente devido à ação do prebiótico, do probiótico ou, até mesmo, do antibiótico. Ainda na mesma região, o microrganismo *Geobacter bemidjiensis* esteve presente praticamente em todas as dietas e, conseqüentemente, em todos os períodos estudados.

Estruturas da comunidade bacteriana do intestino de leitões suplementados com antibióticos e extratos herbais foram analisadas por Pedroso et al. (2005) e a maior similaridade de microrganismos se deu em função do local de amostragem do que do tratamento administrado, estando de acordo com os resultados encontrados na presente pesquisa.

As bactérias não são distribuídas ao acaso ao longo do trato intestinal, mas as diferentes espécies e níveis populacionais ocorrem de forma específica de acordo com características de cada região intestinal. Essas especificidades são resultantes de diferenças de pH, presença de enzimas digestivas e sais biliares que podem modificar o microambiente da comunidade bacteriana (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999).

Como mostrado na Figura 3, representando a região do ceco, foram encontradas *Burkholderia xenovorans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Eubacterium minutum* e *Lactobacillus rhamnosus* em todas as dietas e em todos os períodos estudados. Destaca-se a *Lactobacillus rhamnosus*, que apresenta características probióticas.

Lactobacillus rhamnosus atuam prevenindo a ação de microrganismos patogênicos, principalmente com a acidificação do meio, tornando-o impróprio ao desenvolvimento de outros microrganismos indesejáveis. Este microrganismo é comum na flora intestinal de suínos e a sua presença torna-se importante na saúde dos animais pela sua característica probiótica.

De acordo com Modler, McKellar e Yaguchi (1990), os oligossacarídeos (frutoligossacarídeo e transgalactoligossacarídeo) são fermentados no ceco e promovem o aumento do número de *lactobacilos*. Estas bactérias suprimem o crescimento de patógenos e bactérias putrefáticas pela produção de ácido acético e ácido láctico, que reduzem o pH intestinal, reduzindo a incidência de diarreia.

Lactobacillus rhamnosus reduziu a morbidade de *E. coli* O157: H7 em camundongos infectados experimentalmente, estimulando o aumento da atividade fagocítica e dos títulos de anticorpos específicos na IgA (SHU; GILL, 2002). Perdigón et al. (1999) demonstraram que *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* interagiram com as células M das placas de Peyer, estimulando a imunidade secretora específica.

A influência da administração oral de diferentes espécies de bactérias ácido lácticas foi testada por Vitini et al. (2000), entre elas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*. Estes autores verificaram que o aumento da produção de IgA nem sempre esteve correlacionado com um aumento no número de células T CD₄⁺, indicando que algumas bactérias testadas somente induziram uma ativação das células B produtoras de IgA. Na presente pesquisa, houve aumentos na concentração de IgA ao longo do período experimental, que pode ter sido influenciado pela presença do *Lactobacillus rhamnosus*, estando de acordo com com a citação anterior.

Clostridium sp. Foi encontrado na região cecal, aos 7 dias de experimento, nas dietas contendo prebiótico e antibiótico. Este microrganismo, sendo uma subespécie enteropatogênica, poderá causar doenças em leitões lactentes, podendo provocar altas morbidades e mortalidade, acometendo desde recém-nascidos até leitões com aproximadamente três semanas de idade (COSTA et al., 2004). Neste trabalho, os animais acometidos apresentavam fezes diarreicas de coloração esbranquiçada, apáticos e com baixa taxa de crescimento. Contudo, esses devem ser interpretados com cautela, uma vez que *Clostridium perfringens* é uma bactéria pertencente à microbiota normal de suínos. As várias espécies de *Clostridium* têm grande importância para espécies de bovinos e a indústria de alimentos.

Streptococcus suis estava presente no ceco na dieta contendo prebiótico aos 7 dias, aos 14 dias de experimento na dieta controle. Possivelmente se trata de uma subespécie não enteropatogênica, por não ter sido possível encontrar piora no desempenho dos leitões, no período avaliado.

Apesar de os microrganismos encontrados serem bastante variáveis, estes não foram significativos ao ponto de apresentar desafio e gerar piora no

desempenho dos animais na fase de creche. Outro fato que notadamente não influenciou o desempenho dos animais foi também o bom status sanitário dos animais e medidas de limpeza e higiene adotadas durante a execução do experimento.

Faz-se uma observação para *Escherichia coli* na região ileal e *Streptococcus suis* no ceco, podendo ser considerados os mais importantes do ponto de vista de saúde intestinal. Porém, as bactérias identificadas não foram importantes o suficiente para promover diarreias e provocar piora no desempenho dos animais.

Os resultados sugerem pesquisas com maior desafio aos animais, de forma que os mesmos possam expressar com mais nitidez seus efeitos relativos à sua resposta imunológica. Mais pesquisas se fazem necessárias, com o objetivo de entender os mecanismos de interação entre microbiota intestinal e o animal hospedeiro, importante para buscar o aditivo que melhor convém para cada fase animal.

4 CONCLUSÕES

O uso de prebiótico, probiótico e antibiótico influencia a população microbiana no íleo e no seco.

O probiótico *Bacillus subtilis* possivelmente não foi capaz de colonizar o trato gastrintestinal do leitões, por não ser espécie-específica.

Não foi possível caracterizar que as sequências gênicas encontradas para os possíveis microrganismos foram capazes de gerar danos à saúde dos leitões, na fase de creche.

REFERÊNCIAS

COSTA, G. M. et al. Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 401-404, 2004.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solos de manguê contaminado com petróleo**. 2002. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. 417 p.

JENSEN, G. S.; PATTERSON, K. M.; YOON, I. Yeast culture has anti-inflammatory effects and specifically activates NK cells. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 487-500, Nov. 2008.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Development microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 69, n. 5, p. 1035-1045, May 1999.

MODLER, H. W.; MCKELLAR, R. C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and difidogenic factors. **Canadian Institute of Food Science Tecnology Journal**, Ontario, v. 23, n. 1, p. 29-41, Feb. 1990.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST assembled refseq genomes**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriment of swine**. Washington: National Academy, 1998. 189 p.

OVREAS, L. et al. Distritution of bacterioplankton in meronic lake saelevannet, as determined by denturing gradient eletrophoreis of PCR-amplified gene frangments coding for 16s rDNA. **Applied and Enviromental Microbiology**, New York, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, Sept. 1997.

PEDROSO, A. A. et al. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 4, p. 1224-1233, abr. 2005.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A. P. R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. (Ed.). **Probiotics 3: immunodulation by the gut microflora and probiotics**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 213-233.

PRICE, K. L. H. R. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *almonella* infection. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 10, p. 3896-3908, Oct. 2010.

SAITU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method**: a new method for reconstructin phylogenetic tress. Houston: University of Texas Health Science Center, 1987. 425 p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; CHASE, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SHU, Q.; GILL, H. S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20ä) against *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 59-64, Feb. 2002.

TAMURA, K. et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 1596-1599, May 2007.

THOMPSON, J. D. et al. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **European Molecular Biology Laboratory**, Heidelber, v. 22, n. 11, p. 4673-4688, Nov. 1994.

VITINI, E. et al. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. **Biocell**, Mendoza, v. 24, n. 3, p. 223-232, 2000.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribossomal RNA genes for phylogenetics. In: _____. **PCR protocols: a guide to methods and appications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

XAVIER, G. R. **Estudo da comunidade microbiana do solo através de clonagem, eletroforese em géis desnaturantes (DGGE, TGGE) e conformação de fita simples de DNA**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2004. 28 p.

ANEXOS

ANEXO

	Página
TABELA 1A- Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de Peso diário de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 36 dias de idade.....	87
TABELA 2A- Análise de variância e coeficiente de variação para consumo diário de ração para suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos 22 aos 36 dias de idade.....	88
TABELA 3A- Análise de variância e coeficiente de variação para conversão Alimentar de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos 22 aos 36 dias de idade.....	88
TABELA 4A- Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de Peso diário de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	89
TABELA 5A- Análise de variância e coeficiente de variação para consumo diário de ração para suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos 22 aos 54 dias de idade.....	89
TABELA 6A- Análise de variância e coeficiente de variação para conversão Alimentar de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos 22 aos 54 dias de idade.....	90
TABELA 7A- Análise de variância e coeficiente de variação para leucócitos totais de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	90
TABELA 8A- Análise de variância e coeficiente de variação linfócitos de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	91
TABELA 9A- Análise de variância e coeficiente de variação para monócitos de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	91

TABELA 10A-	Análise de variância e coeficiente de variação para eosinófilos de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	92
TABELA 11A-	Análise de variância e coeficiente de variação para basófilos de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	92
TABELA 12A-	Análise de variância e coeficiente de variação para imunoglobulina A de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	93
TABELA 13A-	Análise de variância e coeficiente de variação para imunoglobulina G de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	93
TABELA 14A-	Análise de variância e coeficiente de variação para imunoglobobulina M de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos dos 22 aos 54 dias de idade.....	94

TABELA 1A- Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso diário de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 43 dias de idade

Source	DF	Squares	Sum of Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	0.01682380	0.00240340	2.60	0.0698
Error	12	0.01108300	0.00092358		
Corrected Total	19	0.02790680			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	GPMD21 Mean
0.602857	9.918575	0.030391	0.306400

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.00555600	0.00185200	2.01	0.1671
bloco	4	0.01126780	0.00281695	3.05	0.0598

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.00555600	0.00185200	2.01	0.1671
bloco	4	0.01126780	0.00281695	3.05	0.0598

TABELA 2A- Análise de variância e coeficiente de variação para consumo diário de ração para suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 43 dias de idade

Source	DF	Squares	Sum of Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	0.04245170	0.00606453	2.70	0.0627
Error	12	0.02693430	0.00224453		
Corrected Total	19	0.06938600			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CRMD21 Mean
0.611819	10.34420	0.047376	0.458000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.02942320	0.00980773	4.37	0.0268
bloco	4	0.01302850	0.00325713	1.45	0.2771

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.02942320	0.00980773	4.37	0.0268
bloco	4	0.01302850	0.00325713	1.45	0.2771

TABELA 3A- Análise de variância e coeficiente de variação para conversão alimentar de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 43 dias de idade

Source	DF	Squares	Sum of Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	0.35994830	0.05142119	5.37	0.0056
Error	12	0.11500050	0.00958338		
Corrected Total	19	0.47494880			
R-Square					
0.757868	Coeff Var	Root MSE	CA21 Mean		
	6.354324	0.097895	1.540600		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.20955000	0.06985000	7.29	0.0048
bloco	4	0.15039830	0.03759958	3.92	0.0291
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.20955000	0.06985000	7.29	0.0048
bloco	4	0.15039830	0.03759958	3.92	0.0291

TABELA 4A- Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso diário de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

Source	DF	Squares	Sum of Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	0.02731510	0.00390216	1.85	0.1668
Error	12	0.02532370	0.00211031		
Corrected Total	19	0.05263880			
R-Square					
0.518916	Coeff Var	Root MSE	GPMD32 Mean		
	11.53065	0.045938	0.398400		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.00794080	0.00264693	1.25	0.3337
bloco	4	0.01937430	0.00484358	2.30	0.1191
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	0.00794080	0.00264693	1.25	0.3337
bloco	4	0.01937430	0.00484358	2.30	0.1191

TABELA 5A- Análise de variância e coeficiente de variação para consumo diário de ração para suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

Source	DF	Squares	Mean Square	Sum of Squares	F Value	Pr > F
Model	7	0.03070015	0.00438574		2.20	0.1105
Error	12	0.02396160	0.00199680			
Corrected Total		19	0.05466175			
R-Square				CRMD32 Mean		
0.561639				0.616750		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
trat	3	0.01521415	0.00507138	2.54	0.1056	
bloco	4	0.01548600	0.00387150	1.94	0.1685	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
trat	3	0.01521415	0.00507138	2.54	0.1056	
bloco	4	0.01548600	0.00387150	1.94	0.1685	

TABELA 6A- Análise de variância e coeficiente de variação para conversão alimentar de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

Source	DF	Squares	Mean Square	Sum of Squares	F Value	Pr > F
Model	7	0.30526190	0.04360884		1.53	0.2466
Error	12	0.34190130	0.02849178			
Corrected Total		19	0.64716320			
R-Square				CA32 Mean		
0.471692				1.594200		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
trat	3	0.17208920	0.05736307	2.01	0.1659	
bloco	4	0.13317270	0.03329318	1.17	0.3726	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
trat	3	0.17208920	0.05736307	2.01	0.1659	
bloco	4	0.13317270	0.03329317	1.17	0.3726	

TABELA 7A- Análise de variância e coeficiente de variação para leucócitos totais de suínos, alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5$ - SQRT ($Y + 0.5$)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REP	4	1.285113	0.321278	1.203	0.3592
TRAT	3	0.652075	0.217358	0.814	0.5103
erro 1	12	3.203539	0.266962		
IDADE	2	7.290936	3.645468	12.480	0.0001
IDADE*TRAT	6	5.022246	0.837041	2.866	0.0238
erro 2	32	9.347214	0.292100		
Total corrigido	59	26.801123			
CV 1 (%) =		11.82			
CV 2 (%) =		12.36			
Média geral:	4.3730212				

Número de observações:

TABELA 8A- Análise de variância e coeficiente de variação linfócitos de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

Opção de transformação: Logaritmo base 10 de Y - Log10 (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REP	4	0.011279	0.002820	0.839	0.5265
TRAT	3	0.001184	0.000395	0.117	0.9483
erro 1	12	0.040345	0.003362		
IDADE	2	0.091203	0.045601	11.369	0.0002
IDADE*TRAT	6	0.008185	0.001364	0.340	0.9104
erro 2	32	0.128358	0.004011		
Total corrigido	59	0.280554			
CV 1 (%) =		3.17			
CV 2 (%) =		3.46			
Média geral:	1.8288929				

Número de observações: 60

TABELA 9A- Análise de variância e coeficiente de variação para monócitos de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REP	4	0.469811	0.117453	3.998	0.0275
TRAT	3	2.101849	0.700616	23.850	0.0000
erro 1	12	0.352509	0.029376		
IDADE	2	4.979011	2.489506	18.803	0.0000
IDADE*TRAT	6	0.417382	0.069564	0.525	0.7847
erro 2	32	4.236804	0.132400		
Total corrigido	59	12.557367			
CV 1 (%) =		10.52			
CV 2 (%) =		22.34			
Média geral:	1.6286121		Número de observações:	60	

TABELA 10A- Análise de variância e coeficiente de variação para eosinófilos de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REP	4	0.123688	0.030922	1.677	0.2196
TRAT	3	0.085728	0.028576	1.549	0.2527
erro 1	12	0.221321	0.018443		
IDADE	2	0.190253	0.095127	3.999	0.0282
IDADE*TRAT	6	0.397682	0.066280	2.786	0.0270
erro 2	32	0.761227	0.023788		
Total corrigido	59	1.779900			
CV 1 (%) =		13.48			
CV 2 (%) =		15.31			
Média geral:	1.0076383		Número de observações:	60	

TABELA 11A- Análise de variância e coeficiente de variação para basófilos de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REP	4	0.257011	0.064253	1.063	0.4164
TRAT	3	0.410831	0.136944	2.266	0.1331
erro 1	12	0.725354	0.060446		
IDADE	2	0.020922	0.010461	0.157	0.8551
IDADE*TRAT	6	0.821157	0.136859	2.059	0.0863
erro 2	32	2.127351	0.066480		
Total corrigido	59	4.362626			
CV 1 (%) =		26.48			
CV 2 (%) =		27.77			
Média geral:	0.9285955		Número de observações:	60	

TABELA 12A- Análise de variância e coeficiente de variação para imunoglobulina A de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	4	0.086757	0.021689	1.354	0.3068
TRAT	3	0.174333	0.058111	3.627	0.0452
erro 1	12	0.192283	0.016024		
PERIOD	2	7.835143	3.917572	105.952	0.0000
PERIOD*TRAT	6	0.336057	0.056009	1.515	0.2050
erro 2	32	1.183200	0.036975		
Total corrigido	59	9.807773			
CV 1 (%) =		9.24			
CV 2 (%) =		14.03			
Média geral:	1.3706667		Número de observações:	60	

TABELA 13A- Análise de variância e coeficiente de variação para imunoglobulina G de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	4	0.071869	0.017967	1.537	0.2536
TRAT	3	0.006075	0.002025	0.173	0.9125
erro 1	12	0.140319	0.011693		
PERIOD	2	0.189664	0.094832	7.445	0.0022
PERIOD*TRAT	6	0.037150	0.006192	0.486	0.8137
erro 2	32	0.407602	0.012738		
Total corrigido		59	0.852678		
CV 1 (%) =		10.71			
CV 2 (%) =		11.17			
Média geral:	1.0100109		Número de observações:	60	

TABELA 14A- Análise de variância e coeficiente de variação para imunoglobobulina M de suínos alimentados com rações contendo prebióticos, probióticos e antibióticos, dos 22 aos 54 dias de idade.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	4	0.053828	0.013457	0.744	0.5802
TRAT	3	0.073198	0.024399	1.349	0.3050
erro 1	12	0.217039	0.018087		
PERIOD	2	0.139617	0.069809	5.178	0.0113
PERIOD*TRAT	6	0.133492	0.022249	1.650	0.1657
erro 2	32	0.431450	0.013483		
Total corrigido		59	1.048625		
CV 1 (%) =		10.86			
CV 2 (%) =		9.37			
Média geral:	1.2388259		Número de observações:	60	