

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO
JEQUITINHONHA E MUCURI

GABRIELLE SILVA SOUZA

USO DE PROBIÓTICO SOBRE A ENERGIA E DIGESTIBILIDADE DE
NUTRIENTES EM RAÇÕES PARA SUÍNOS

DIAMANTINA - MG
2014

GABRIELLE SILVA SOUZA

**USO DE PROBIÓTICO SOBRE A ENERGIA E DIGESTIBILIDADE DE
NUTRIENTES EM RAÇÕES PARA SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Alysson Saraiva

DIAMANTINA - MG
2014

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S729u	Souza, Gabrielle Silva Uso de probiótico sobre a energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos / Gabrielle Silva Souza. – Diamantina: UFVJM, 2014. 39 p. : il. Orientador: Alysson Saraiva Coorientador: Melissa Izabel Hannas Dissertação (Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 1. Balanço de nitrogênio. 2. Energia metabolizável. 3. Metabolismo. 4. Probiótico. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. CDD 636.4
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GABRIELLE SILVA SOUZA

**USO DE PROBIÓTICO SOBRE A ENERGIA E DIGESTIBILIDADE DE
NUTRIENTES EM RAÇÕES PARA SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA em 19/09/2014.

Prof. Alysson Saraiva - UFV
Orientador

Prof.^a Melissa Izabel Hannas - UFV
Coorientadora

Prof. Joerley Moreira – UFVJM

DIAMANTINA - MG
2014

RESUMO

SOUZA, Gabrielle Silva. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, setembro de 2014. 39p. **Uso de probiótico sobre a energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos.** Orientador: Alysson Saraiva. Coorientadora: Melissa Izabel Hannas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

Para avaliar os efeitos do uso de probióticos sobre a metabolizabilidade da energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos, realizou-se um experimento com 32 suínos, machos castrados, com peso de $31,2 \pm 4,7$ Kg, distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados, em arranjo fatorial 2×2 , sendo dois níveis de energia metabolizável (3200 e 3300 kcal/kg de energia metabolizável), com ou sem adição de probiótico, em 4 tratamentos e 8 repetições com um animal por unidade experimental. Os tratamentos foram assim constituídos: T1 - ração com 3200 kcal/kg de EM (3200 EM), T2 - ração T1 + 400 g/tonelada de probiótico (3200 EM+P), T3 - ração com 3300 kcal/kg de EM (3300 EM) e T4 - ração T3 + 400 g/tonelada de probiótico (3300 EM+P) e o período experimental foram de 10 dias, sendo 5 dias para adaptação dos suínos às gaiolas e 5 dias para coleta de fezes e urina. Foram determinados os valores digestíveis da energia (ED), energia metabolizável (EM), energia metabolizável corrigida para balanço de nitrogênio (EMn), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EED), fibra bruta (FD), fibra em detergente neutro (FDND) e fibra em detergente ácido (FDAD), matéria mineral (MMD), cálcio (CaD) e fósforo (PPD) das rações, para cálculo dos coeficientes de metabolizabilidade e digestibilidade da energia e dos nutrientes. Maiores valores ($P < 0,05$) de ED, EM e EMn, FDAD, EED e coeficiente de digestibilidade de extrato etéreo foram determinados na ração contendo 3300 EM+P. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as rações em relação aos coeficientes de digestibilidade e metabolizabilidade de energia, assim como para os valores de MMD, CaD, PPD, PD, FD e FDND. A inclusão de probiótico nas rações proporcionou incremento na energia das rações, devido à melhoria na digestibilidade da FDA e EE.

Palavras-chave: balanço de nitrogênio, energia metabolizável, metabolismo, probiótico.

ABSTRACT

SOUZA, Gabrielle Silva. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, setembro de 2014. 39p. **Use of probiotic on energy and nutrient digestibility in diets for pigs.** Adviser: Alysso Saraiva. Committee members: Melissa Izabel Hannas. Dissertation (Master's degree in Animal Science).

To evaluate the effects of probiotics on the metabolizable energy and digestibility of nutrients in diets for pigs, we made an experiment with 32 pigs, barrows weighing 31.2 ± 4.7 Kg distributed in experimental design randomized blocks in a 2x2 factorial arrangement, with two levels of metabolizable energy (3200 and 3300 kcal / kg metabolizable energy), with or without added probiotic in 4 treatments and 8 repetitions with an animal per experimental unit. Treatments were: T1 - diet with 3200 kcal / kg of ME (3200 ME), T2 - T1 diet + 400 g / ton probiotic (3200 ME + P), T3 - diet with 3300 kcal / kg of ME (3300 ME) and T4 - T3 diet + 400 g / ton probiotic (3300 ME + P) and the experimental period was 10 days, with 5 days for adaptation of pigs cages and 5 days for collection of faeces and urine. We evaluated the digestible of energy (DE), metabolizable energy (ME), metabolizable energy corrected for nitrogen (MEn), crude protein (CP), ether extract (EE), crude fiber (FD), neutral detergent fiber (DNDF) and acid detergent fiber (DADF), mineral matter (MMD), calcium (CaD) and phosphorus (PPD) to calculate the coefficients of digestibility and metabolizable energy and nutrients. Higher values were found ($P < 0.05$) of ED, ME, MEn, DADF, EE and digestibility of ether extract in diets containing 3300 ME + P. There was no difference ($P > 0.05$) among diets in relation to digestibility and metabolizable energy, as well as the values of PD, FD, DNDF, MMD, CaD and PPD. The inclusion of probiotics in feed resulted in increased energy rations due to improved digestibility of DADF and EE.

Keywords: nitrogen balance, metabolism, metabolizable energy, probiotic.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Geraldo Delfino Souza e Marlene Gomes da Silva Souza.
À minha irmã Ana Cláudia Souza.*

DEDICO

AGRADECIMENTO

Primeiramente, a Deus, por guiar meus passos.

A meus pais, Geraldo Delfino Souza e Marlene Gomes da Silva Souza e à minha irmã Ana Cláudia Souza, que me apoiaram, incondicionalmente, dando força e suporte para sempre continuar.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, principalmente ao Departamento de Zootecnia, por abrir suas portas em 2012, para realização do curso de Mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo acolhimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFVJM.

Ao orientador Alysson Saraiva e co-orientadora Melissa Hannas, pelos ensinamentos, oportunidades, paciência e confiança na condução dos trabalhos.

À CHR. Hansen pela oportunidade e financiamento do projeto de pesquisa.

Ao professor, Horácio Santiago Rostagno pelo apoio.

À Sandra Carolina Salguero Cruz pelos ensinamentos.

Aos membros da banca, Prof. Joerley Moreira e Prof^a. Sandra Pinheiro pelas contribuições.

À Elisângela pela compreensão e prestatividade.

Ao professor Edênio Detmann e aos técnicos do Laboratório de Nutrição do Departamento de Zootecnia da UFV, Monteiro e Fernando, por suas contribuições nas análises laboratoriais.

Aos funcionários do setor de Suinocultura da UFV, Fernando, Dedeco, Chico, Raimundo, Valdeir, Vitor, Arlindo, Alessandro e Leandro pela ajuda durante o período experimental.

Aos colegas, Alícia Zem, Soraia Viana, Pedro Arnaut, Marcus Soares, Vinícius Duarte, Igor Bretas, Naiara Marcos, Camila Miranda, Renata Sampaio e Maykelly Gomes pela ajuda no experimento.

Às amigas, Maria de Fátima, Lyvian Cardoso, Keles Inoue, Karoline Duarte e Letícia Reis pelas palavras de apoio e ânimo.

Aos meus amigos de Diamantina, Laís Becatini, Carla Cunha, Ana Flávia Paolineli, Ana Cláudia Protássio, Leonora Valadares, Sâmela Keila, Felipe Rosa, Felipe Santos, Patrícia Dias e Flávio Mota pela amizade.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a todos!

BIOGRAFIA

GABRIELLE SILVA SOUZA, filha de Geraldo Delfino Souza e Marlene Gomes da Silva Souza, nasceu em 04 de junho de 1986, natural de Ipatinga – MG. Em março de 2005, iniciou o curso de Zootecnia, pela Universidade Federal Viçosa, graduando-se em janeiro de 2011. Em setembro de 2012, iniciou o curso de mestrado em Zootecnia, na área de Nutrição e Produção de Monogástricos, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus Diamantina - MG.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Probióticos	11
2.2. Probióticos e a produção de enzimas	12
2.3. Probióticos e balanço da microbiota intestinal	15
3. ARTIGO: Uso de probióticos sobre a energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos	17
3.1. RESUMO	17
3.2. ABSTRACT	18
3.3. INTRODUÇÃO	19
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.6. CONCLUSÃO.....	32
3.7. REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo (ABIPECS, 2013). Os investimentos na modernização do sistema produtivo buscam o máximo desempenho com custos mínimos, visando o elevado potencial de mercado que o setor de produção de carne suína pode alcançar, e os avanços na nutrição são economicamente significativos, já que a alimentação é responsável por cerca de 70% dos custos da produção.

A nutrição de suínos visa atender a demanda de nutrientes que os animais necessitam para que estes expressem todo seu potencial produtivo, a um baixo custo e respeitando princípios básicos para que não ocorram riscos à sociedade consumidora. Isso porque desde 2008, a União Européia banuiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento em rações, com a Diretiva 1831/2003/EC (UE, 2008), sob a justificativa de veiculação de resíduos de antibióticos no alimento, a seleção de bactérias patogênicas no trato entérico humano, e a própria veiculação de bactérias resistentes, podendo causar patogenias aos consumidores.

Em alternativa ao uso de antibióticos, é importante determinar nutrientes e aditivos que favoreçam o desempenho e saúde dos animais. Considerando as características do trato gastrointestinal e os desafios aos quais os suínos são submetidos, pesquisas têm sido realizadas para avaliar os benefícios no desempenho e o mecanismo de ação dos probióticos adicionados as rações.

Probióticos são definidos por serem organismos vivos que ao serem ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (ARAYA *et al.*, 2002). (Dê uma conferida nessa citação, pois o texto está repetitivo). Os benefícios de seu uso incluem melhoria no desempenho, na retenção de nutrientes, na saúde e no equilíbrio da microflora intestinal.

Os probióticos produzem exoenzimas como a α -amilase, arabinase, celulase, dextranase, levansucrase, maltase, protease alcalina, protease neutra e β -glucanase que degradam e auxiliam no processo de digestão dos alimentos, melhorando a digestibilidade e a eficiência alimentar (GIANG *et al.*, 2012).

Entretanto, em suínos, respostas do uso de probióticos sobre os valores de energia digestível, metabolizável e digestibilidade de nutrientes são escassos ou apresentam resultados contraditórios, sendo observados aumentos de 1,54% e 1,73% no coeficiente de digestibilidade e metabolizabilidade de energia, respectivamente (HUAYNATE, 2008).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de probiótico *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* sobre a digestibilidade dos nutrientes, e o aproveitamento de energia em rações para suínos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Probióticos

A suinocultura tem enfrentado novos desafios diante as exigências dos consumidores quanto à qualidade e sanidade dos produtos. Com a atual legislação que proíbe o uso de antibióticos como promotores de crescimento, tem-se buscado alternativas que substituam seu uso sem prejuízos na produtividade e no desempenho dos animais. Neste contexto, a inclusão de probiótico em rações para suínos vem sendo amplamente estudada.

Probióticos, palavra derivada do grego e significa "para a vida" (QUIGLEY, 2010), são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Para garantir seus efeitos funcionais, os probióticos precisam ser habitantes normais do trato gastrointestinal, devem ser espécies-específicos; ser capazes de produzir culturas viáveis em concentrações efetivas, superiores a 10^8 a 10^{11} Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de produto; ser capazes de se multiplicarem rapidamente, após a ingestão do produto; ser tolerante às enzimas salivares, ácidos estomacais, sais biliares no intestino delgado e ácido orgânico volátil no intestino grosso; eles devem ser capazes de aderir às células epiteliais do intestino; não podem ser patogênicos e nem produzir efeitos adversos para o hospedeiro; devem ser estáveis e precisam manter sua viabilidade quando estocados (SANTOS *et al.*, 2011).

Dentre os microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal, os principais grupos são: Bacteróides, Clostridium, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Enterobacteriaceae, Streptococcus, Fusobacterium, Peptostreptococcus e Propionibacterium (GAGGIÀ *et al.*, 2010). A microbiota gastrointestinal pode ser considerada como uma população metabolicamente ativa, com sua larga diversidade em termos de espécies e elevado número de microrganismos (MACFARLANE, 2004; BACKHED *et al.*, 2005). Muitas destas espécies são utilizadas como probióticos (HAMMES & HERTEL, 2007), as mais utilizadas são: os lactobacilos, bifidobactérias e algumas leveduras não patogênicas (SCHULZ *et al.*, 2005).

Há vários efeitos benéficos atribuídos ao consumo de probióticos, os que mais se destacam são: o controle e estabilização da microbiota intestinal, auxílio na digestão,

promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, estimulação do sistema imune, competição contra microrganismos indesejáveis, aumento da absorção de minerais, modulação de funções fisiológicas como a absorção de cálcio, no metabolismo lipídico e produção de enzimas e vitaminas (OLIVEIRA; BATISTA, 2003).

2.2.Probióticos e a produção de enzimas

Os probióticos foram descritos primeira vez por Metchnikoff, em 1908, com base em suas observações sobre a longevidade dos indivíduos que viviam em uma determinada parte da Bulgária e que ele atribuiu à sua ingestão regular, de um produto de leite fermentado (QUIGLEY, 2010). Em 1958, na Itália, há registros do uso de espécies de *Bacillus* como probióticos usados como suplementos medicinais para humanos (CUTTING, 2011).

Estas substâncias têm a capacidade de influenciar a população microbiana promovendo equilíbrio microbiano intestinal (OHH, 2011), e suas características englobam habilidade de colonizar o trato gastrointestinal, alta taxa de crescimento com baixa exigência de nutrientes, supressão de patógenos entéricos, bem como suas células e metabólitos e é viável após processamento (LANGE, 2010).

Os microorganismos mais utilizados com esta finalidade são aqueles oriundos ou semelhantes às bactérias comensais benéficas do intestino dos animais (ROSS *et al.*, 2010). As bactérias ácido-láticas, gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, são comumente utilizadas (LI, 2003; RICHARDS; GONG; LANGE, 2005), no entanto, estas bactérias não são eficientes em formar esporos e por isso sua resistência fica fragilizada ao processamento. Dessa forma, os probióticos bacilares, especialmente bactérias do gênero *Bacillus*, têm sido amplamente utilizadas, pois são formadoras de esporos. Porém, não colonizam o trato e precisam de reinoculação, pois sua população diminui após 24h sem ingestão (SANDERS *et al.*, 2003).

Probióticos na forma de esporos são amplamente utilizados na produção animal como promotores de crescimento (CUTTING, 2011). Desde os anos 50 é relatada a capacidade de várias espécies de bactérias do gênero *Bacillus* de produzir enzimas como a subtilisina, subtilina, as proteases e as termolisinas. O interesse científico nas espécies de *Bacillus* é relativamente novo, assunto dos últimos 15 anos (SCHULZ *et al.*, 2005). As espécies mais estudadas são: *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis*. Seus esporos são termoestáveis e possuem várias vantagens sobre as formas vegetativas, como podem ser armazenados em temperatura ambiente e de forma

desidratada sem efeito deletério em sua viabilidade, algumas espécies são capazes de sobreviver no baixo pH do estômago chegando ao intestino intactos (SPINOSA *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2005; TUOHY *et al.*, 2007).

Os modos de ação benéficos dos probióticos, além da regulação da homeostase intestinal, a estabilização da função de barreira gastrointestinal (LAMBERT, 2009), expressão de bacteriocinas (MAZMANIAN *et al.*, 2008), efeitos imunomoduladores (SALZMAN *et al.*, 2003; DENG *et al.*, 2013), inibição de enzimas e interferência na capacidade de agentes patogênicos para colonizar e infectar a mucosa (GILL, 2003), também possuem atividade enzimática que melhora a digestão e absorção de nutrientes (HOOPER *et al.*, 2002; TIMMERMAN *et al.*, 2005; GIANG *et al.*, 2012).

Bacillus licheniformis e *Bacillus subtilis* são bactérias classificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo U.S. Food and Drug Agency, (2003), são microorganismos amplamente encontrados e distribuídos na natureza (VEITH *et al.*, 2004) e muito utilizados em fermentações industriais, na produção de antibióticos e fabricação de enzimas.

Dentre as enzimas, pode-se citar as proteases (WESTERS *et al.*, 2004; HARWOOD; CRANENBURGH, 2007) e amilases (WESTERS *et al.*, 2004; VIDYALAKSHMI *et al.*, 2009). A grande maioria de proteases existentes no mercado atualmente é derivada do gênero *Bacillus* (JOO *et al.*, 2004) devido à sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Estes organismos não somente produzem uma apropriada gama de enzimas como também tem a capacidade de secretá-las em médias a altas concentrações no meio (WONG, 1995; HARWOOD; CRANENBURGH, 2008) para degradar uma variedade de substratos (WESTERS *et al.*, 2004).

O trato gastrointestinal dos suínos possui pH que varia de 1,7 a 2,0 no estômago, acidez proveniente do HCL que compõe o suco gástrico, este pH atua como barreira para a multiplicação de microorganismos patogênicos, porém não é obstáculo para bactérias do gênero *Bacillus*. No duodeno, as glândulas de Brunner são responsáveis pela secreção de um líquido alcalino, cuja função é lubrificar e proteger a parede do duodeno da ação do HCl vindo do estômago, aumentando o pH intestinal (LOVATTO, 2002). Este aumento de pH proporciona um ambiente ideal para atuação de enzimas, especialmente aquelas produzidas por bactérias ácido lácticas, favorecidas pelo equilíbrio promovido por *Bacillus spp.*

A enzima α -amilase é produzida por ambas as espécies, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, sua condição ótima inclui temperatura de 37°C (IBRAHIM *et al.*, 2012) e pH próximo de 6,8 (VIDYALAKSHMI *et al.*, 2009), e é responsável por hidrolisar parcialmente

as ligações α -1,4, liberando maltodextrinas com conseqüente efeito de redução da viscosidade (GOMES *et al.*, 2007).

Além da α -amilase, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* também produzem protease alcalina (CHAUD *et al.*, 2007) e protease neutra (SHULZ *et al.*, 2012). A temperatura ideal para produção de proteases e crescimento microbiano é também de 37°C e pH que varia de 8,0- 11,0 (MABROUK, 1999; PATEL, 2005; CHAUD *et al.*, 2007).

Vários são os estudos que comprovam melhorias no ganho de peso (YU *et al.*, 2008; DELIA *et al.*, 2010), conversão alimentar, consumo de ração e eficiência alimentar com a adição de probióticos às dietas de leitões desmamados (GIANG *et al.*, 2010; GIANG *et al.*, 2012) e em crescimento e terminação (MENG *et al.*, 2010).

Alguns experimentos mostram a diferença na digestibilidade, absorção e aproveitamento de nutrientes com a adição de probióticos à ração. Giang *et al.* (2010) encontrou maior coeficiente de digestibilidade aparente ileal para matéria orgânica, proteína bruta e fibra bruta em leitões após duas semanas do desmame, com a utilização de bactérias produtoras de ácido láctico, porém não encontrou diferença no período de 3 a 5 semanas pós desmama para as mesmas variáveis. Meng *et al.* (2010) trabalhando com suínos na fase de crescimento e terminação encontrou diferença significativa na digestibilidade aparente total de nitrogênio e energia, apresentando melhor digestibilidade com a inclusão de probióticos a base de *Bacillus subtilis*.

Em experimento com frangos de corte realizado por Sen *et al.* (2012), as aves suplementadas com níveis crescentes de *Bacillus subtilis* apresentaram maior retenção de nutrientes, ganho de peso, consumo de ração e melhor conversão alimentar, durante a fase de crescimento e terminação. Da mesma forma, em experimento com aves, Flemming & Freitas (2005) avaliaram o efeito da adição de probióticos a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* comparados aos tratamentos com probiótico e mananoligossacarídeos (MOS) e promotor de crescimento (avilamicina). Os resultados obtidos pelos autores foram que a adição de probiótico e MOS proporcionaram melhor ganho de peso e conversão alimentar quando comparados com os grupos com promotor de crescimento e controle.

Li *et al.* (2008) encontraram melhor desempenho dos frangos, também maior digestibilidade ileal da matéria seca, proteína bruta, energia, cálcio e fósforo com a inclusão de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* às dietas de frangos de corte.

2.3.Probióticos e balanço da microbiota intestinal

O trato gastrointestinal é colonizado por vários microorganismos, patogênicos e não patogênicos. Os microorganismos patogênicos são aqueles capazes de causar doenças infecciosas aos seus hospedeiros sempre que estiverem em circunstâncias favoráveis causando perdas no desempenho e na produção. A utilização de probióticos na ração é uma estratégia nutricional muito utilizada na produção animal para melhorar a utilização dos nutrientes pelo restabelecimento da microbiota.

Entretanto, para que os nutrientes das dietas sejam devidamente digeridos e absorvidos, a mucosa intestinal deve apresentar características estruturais morfofisiológicas adequadas. Os processos de absorção são dependentes de mecanismos de transporte que ocorrem na membrana das células epiteliais da mucosa, tornando de suma importância à manutenção de sua integridade, já que esta é a via de entrada dos nutrientes para o desenvolvimento do animal (MAIORKA, 2004).

A mucosa intestinal é composta por projeções microscópicas denominadas vilos, estes são constituídos por enterócitos e células caliciformes. Os enterócitos são células que respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte transepitelial dos nutrientes a partir do lúmen. Estas células apresentam um processo de maturação que ocorre durante o processo de migração da cripta (base) para o ápice do vilos. As células caliciformes são secretoras de muco, que tem a função de proteger o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. Quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilos, e, por consequência, maior a área de absorção de nutrientes.

Situações como jejum, alterações da dieta, estresse e desequilíbrio da microbiota gastrointestinal podem ocasionar redução da camada protetora de muco e, propiciar a ação de bactérias e protozoários patogênicos e, conseqüentemente, o desencadeamento de processos lesivos na mucosa, reduzindo sua capacidade digestiva e absorviva e causando um prejuízo no aproveitamento de nutrientes (MAIORKA, 2004). Em estudo com frangos de corte, Sen *et al.*, (2012), encontraram que a suplementação com *Bacillus subtilis* proporcionou aumento do número de vilosidades e a altura das vilosidades em relação à profundidade de cripta no duodeno e íleo, confirmando um possível efeito do probiótico em questão na manutenção da integridade da mucosa.

Por isso, é comum a utilização de probióticos para manutenção do balanço microbiano, já que estes afetam positivamente o hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota gastrointestinal (SHIM *et al.*, 2010). Este balanço que ocorre entre

microorganismos patogênicos e não patogênicos se dá por três maneiras, competição por adesão aos receptores no epitélio (FURLAN *et al.*, 2004; SAAD, 2006; LI *et al.*, 2008), competição por nutrientes (SEN *et al.*, 2012; SAAD 2006), e produção de substâncias antimicrobianas (SHULZ *et al.*, 2005; GAGGIÀ *et al.*, 2012; SAAD, 2006).

Tem sido relatado que o *Bacillus subtilis* aumenta o crescimento e a viabilidade de lactobacilos, possivelmente por meio da produção de catalase e subtilisina (HOSOI *et al.*, 2000). Pelo metabolismo anaeróbio facultativo, o *Bacillus subtilis* tende a consumir oxigênio livre no intestino e melhorar o crescimento de lactobacilos (KAUR *et al.*, 2002). Além disso, os esporos de *Bacillus subtilis* são resistentes ao pH ácido e oxigênio, quando administrados por via oral podem atingir o intestino e, em seguida, afetar a população microbiana. Isto indica que a utilização de *Bacillus subtilis* pode ter uma interação na manutenção do equilíbrio da microbiota, pelo favorecimento de bactérias benéficas, neste caso, os lactobacilos. Assim, Teo; Tan (2007) reportaram uma redução de bactérias do gênero *Clostridium* com a adição de *Bacillus subtilis* a dietas de frangos de corte na fase final.

Os probióticos auxiliam também a recompor a microbiota pela adesão e colonização na mucosa intestinal, processo denominado exclusão competitiva (SAAD, 2006), o qual microorganismos benéficos ocupam os sítios de ligação na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas. Esta ação impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas, dessa forma, mantém o balanço da microbiota intestinal.

Trabalhando com leitões desmamados, Giang *et al.* (2010) encontraram resultados em que a suplementação com probióticos a base de bactérias ácido lácticas reduziu o número de *E. coli* no íleo, isto foi devido à liberação de componentes protéicos que inibem a adesão de bactérias patogênicas à mucosa do íleo e a produção de ácido láctico. Meng *et al.* (2010) também encontraram resultados positivos ao trabalharem com bactérias do gênero *Bacillus* e relacionou a melhoria na digestibilidade de nutrientes, ao equilíbrio da microbiota para suínos em crescimento e terminação.

Adicionalmente, os probióticos competem com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no trato intestinal, limitando o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro (SAAD, 2006). Além disso, eles também podem impedir a multiplicação de seus competidores, por meio de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas (SCHULZ *et al.*, 2005). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas e também por algumas do gênero *Bacillus*. Sob a designação de bacteriocinas, são muitas as substâncias extraídas e

caracterizadas, como exemplo a subtilina, iturina e surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* e bacilocina e liquesina produzida pelo *Bacillus licheniformis*, (SCHULZ *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2010).

O equilíbrio da microbiota exercido pela presença de substâncias antimicrobianas produzidas pelas bactérias benéficas, competição por nutrientes e exclusão competitiva tendem a melhorar a integridade do epitélio absorptivo do trato intestinal, suas vilosidades e criptas, proporcionando uma maior superfície de contato e melhor eficiência na digestão, absorção e aproveitamento de nutrientes.

3. ARTIGO: Uso de probióticos sobre a energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos

3.1.RESUMO

SOUZA, Gabrielle Silva. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, setembro de 2014. 39p. **Uso de probiótico sobre a energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos.** Orientador: Alysson Saraiva. Co-orientadora: Melissa Izabel Hannas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

Para avaliar os efeitos do uso de probióticos sobre a metabolizabilidade da energia e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos, realizou-se um experimento com 32 suínos, machos castrados, com peso de $31,2 \pm 4,7$ Kg, distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados, em arranjo fatorial 2x2, sendo dois níveis de energia metabolizável (3200 e 3300 kcal/kg de energia metabolizável), com ou sem adição de probiótico, em 4 tratamentos e 8 repetições com um animal por unidade experimental. Os tratamentos foram assim constituídos: T1 - ração com 3200 kcal/kg de EM (3200 EM), T2 - ração T1 + 400 g/tonelada de probiótico (3200 EM+P), T3 - ração com 3300 kcal/kg de EM (3300 EM) e T4 - ração T3 + 400 g/tonelada de probiótico (3300 EM+P) e o período experimental foram de 10 dias, sendo 5 dias para adaptação dos suínos às gaiolas e 5 dias para coleta de fezes e urina. Foram determinados os valores digestíveis da energia (ED), energia metabolizável (EM), energia metabolizável corrigida para balanço de nitrogênio (EMn), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EED), fibra bruta (FD), fibra em detergente neutro (FDND) e fibra em detergente ácido (FDAD), matéria mineral (MMD), cálcio (CaD) e fósforo (PPD) das rações, para cálculo dos coeficientes de metabolizabilidade e digestibilidade da energia e dos nutrientes. Maiores valores ($P < 0,05$) de ED, EM e EMn, FDAD, EED e coeficiente de digestibilidade de extrato etéreo foram determinados na ração contendo 3300 EM+P. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as rações em relação aos coeficientes de digestibilidade e metabolizabilidade de energia, assim como para os valores de MMD, CaD, PPD, PD, FD e FDND. A inclusão de probiótico nas rações proporcionou incremento na energia das rações, devido à melhoria na digestibilidade da FDA e EE.

Palavras-chave: balanço de nitrogênio, energia metabolizável, metabolismo, probiótico.

3.2.ABSTRACT

SOUZA, Gabrielle Silva. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, setembro de 2014. 39p. **Use of probiotic on energy and nutrient digestibility in diets for pigs.** Adviser: Alysson Saraiva. Committee members: Melissa Izabel Hannas. Dissertation (Master's degree in Animal Science).

To evaluate the effects of probiotics on the metabolizable energy and digestibility of nutrients in diets for pigs, we made an experiment with 32 pigs, barrows weighing 31.2 ± 4.7 Kg distributed in experimental design randomized blocks in a 2x2 factorial arrangement, with two levels of metabolizable energy (3200 and 3300 kcal / kg metabolizable energy), with or without added probiotic in 4 treatments and 8 repetitions with an animal per experimental unit. Treatments were: T1 - diet with 3200 kcal / kg of ME (3200 ME), T2 - T1 diet + 400 g / ton probiotic (3200 ME + P), T3 - diet with 3300 kcal / kg of ME (3300 ME) and T4 - T3 diet + 400 g / ton probiotic (3300 ME + P) and the experimental period was 10 days, with 5 days for adaptation of pigs cages and 5 days for collection of faeces and urine. We evaluated the digestible of energy (DE), metabolizable energy (ME), metabolizable energy corrected for nitrogen (MEn), crude protein (CP), ether extract (EE), crude fiber (FD), neutral detergent fiber (DNDF) and acid detergent fiber (DADF), mineral matter (MMD), calcium (CaD) and phosphorus (PPD) to calculate the coefficients of digestibility and metabolizable energy and nutrients. Higher values were found ($P < 0.05$) of ED, ME, MEn, DADF, EE and digestibility of ether extract in diets containing 3300 ME + P. There was no difference ($P > 0.05$) among diets in relation to digestibility and metabolizable energy, as well as the values of PD, FD, DNDF, MMD, CaD and PPD. The inclusion of probiotics in feed resulted in increased energy rations due to improved digestibility of DADF and EE.

Keywords: nitrogen balance, metabolism, metabolizable energy, probiotic.

3.3.INTRODUÇÃO

Os probióticos têm demonstrado serem eficazes na manutenção da microbiota intestinal e em melhorar a saúde animal. Com a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento, eles também têm sido vistos como alternativa para substituí-los, devido seus efeitos benéficos no desempenho de suínos.

Além de favorecer o crescimento de *Lactobacillus*, os probióticos promovem o equilíbrio da microbiota também pela produção de substâncias antimicrobianas, competição por nutrientes e por sítios de adesão, e ainda produzem enzimas que melhoram a digestão e absorção de nutrientes.

Dois dos microorganismos mais estudados dentro do seu gênero são os *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, eles melhoram desempenho e eficiência alimentar em leitões (GIANG *et al.*, 2012) e em suínos em crescimento e terminação (MENG *et al.*, 2010). Porém, resultados do quanto melhoram o processo de digestão ainda são poucos.

Portanto, o presente estudo visa avaliar os efeitos do uso de probiótico sobre os valores de energia digestível, metabolizável e digestibilidade de nutrientes em rações para suínos em crescimento.

3.4.MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa, processo número 15/2014 e conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da mesma instituição, nos meses de novembro e dezembro de 2013.

O probiótico utilizado possui composição mínima de *Bacillus licheniformis* em $1,6 \times 10^9$ UFC/g e de *Bacillus subtilis* em $1,6 \times 10^9$ UFC/g. As rações após análise apresentaram T1 $< 1,0 \times 10^5$ UFC/g, T2 = $1,74 \times 10^6$ UFC/g, T3 $< 1,0 \times 10^5$ UFC/g e T4 = $1,71 \times 10^6$ UFC/g, garantindo os níveis estimados para cada tratamento.

Foram utilizados 32 suínos, machos castrados, com peso de $31,2 \pm 4,7$ kg, distribuídos em delineamento experimental em 2 blocos casualizados no tempo, em arranjo fatorial 2x2, dois níveis de energia metabolizável (3200 e 3300 kcal de EM/kg), com ou sem adição de probiótico, em 4 tratamentos e 8 repetições com um animal por unidade experimental.

As rações experimentais (Tabela 1) foram formuladas de acordo com as recomendações de Rostagno *et al.* (2011), para suínos de 30 kg. Os tratamentos foram constituídos por: T1–Ração com 3200 kcal/kg de EM (3200 EM); T2 – Ração T1 + 400 g

/tonelada de probiótico (3200 EM+P); T3 – Ração com 3300 kcal/kg de EM (3300 EM) e T4 – Ração T3 + 400 g /tonelada de probiótico (3300 EM+P).

Os animais foram alojados em gaiolas de metabolismo, semelhantes às descritas por Pekas (1968), localizadas em prédio de alvenaria, com piso de concreto e coberto com telhas de cerâmica.

O período experimental foi 5 dias de adaptação às gaiolas, às dietas e para determinação da quantidade de ração a ser fornecida em função do peso metabólico do animal e, 5 dias para fornecimento de ração e coleta de fezes e urina, totalizando 10 dias para o primeiro bloco com 16 animais. Utilizou-se outros 10 dias para o segundo bloco com os mesmos animais, alterando os tratamentos, sem repetir o mesmo nível de energia e inclusão de probiótico para os animais que os receberam no bloco anterior.

Foi adotado o método de coleta total de fezes, com o uso de marcador óxido férrico para determinar o início e final das coletas, sendo que estas foram realizadas, duas vezes ao dia, às 08:00 e às 16:00 horas. As amostras de fezes de cada animal foram coletadas, pesadas, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em freezer. Após o período de coleta, as amostras de cada animal foram descongeladas em temperatura ambiente, durante aproximadamente 12 horas, sendo homogeneizadas e retirando-se uma nova amostra, que foi seca em estufa de ventilação forçada a 60°C, por um período de 72 horas.

Depois de retiradas da estufa e atingido o equilíbrio com a temperatura ambiente, as amostras foram pesadas, moídas e acondicionadas em frascos com tampa, para posterior realização das análises laboratoriais.

A urina excretada pelos animais foi coletada em baldes plásticos contendo 20 mL de HCl, já diluído em água na proporção 1:1, para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. O volume excretado em um período de 24 horas foi aferido, retirando-se uma amostra de 5%, que foi colocada em recipiente de vidro com tampa e armazenada em geladeira a 3°C. No final do período de coleta, a urina armazenada foi novamente homogeneizada, filtrada e retirada outra amostra, a qual foi mantida sob refrigeração, para posterior análise de nitrogênio e energia.

Aproximadamente 50g de amostras de ração e de fezes secas e moídas foram enviadas ao Laboratório de Análises Químicas CBO (Campinas, SP) e 50g para o Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As amostras de urina foram congeladas em tubos de plástico vedados e enviadas ao laboratório CBO em caixa de isopor com gelo gel.

Tabela 1 - Composição centesimal e mínima das rações experimentais

Ingredientes	Tratamentos			
	3200 EM	3200 EM+P	3300 EM	3300 EM+P
Milho (7,88% de PB)	72,52	72,52	71,28	71,28
Farelo de soja (45% de PB)	24,00	24,00	24,00	24,00
Óleo de soja	-	-	1,70	1,70
Suplemento mineral ¹	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento vitamínico ²	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante	0,01	0,01	0,01	0,01
Fosfato bicálcico	1,10	1,10	1,10	1,10
Calcário calcítico	0,70	0,70	0,70	0,70
Sal comum	0,45	0,45	0,45	0,45
Lisina HCL	0,29	0,29	0,29	0,29
DL-Metionina	0,08	0,08	0,09	0,09
L-Treonina	0,08	0,08	0,08	0,08
Inerte³	0,54	0,50	0,08	0,04
Probiótico	-	0,04	-	0,04
Cloreto de colina, 60%	0,04	0,04	0,04	0,04
Total	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição química calculada na matéria natural				
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.200	3.200	3.300	3.300
Proteína bruta (%)	17,26	17,26	17,17	17,17
Extrato etéreo (%)	3,05	3,05	4,71	4,71
Fibra bruta (%)	2,53	2,53	2,51	2,51
Fibra em detergente neutro (%)	11,96	11,96	11,81	11,81
Fibra em detergente ácido (%)	4,39	4,39	4,35	4,35
Matéria mineral (%)	5,20	5,16	4,73	4,69
Cálcio (%)	0,63	0,63	0,63	0,63
Fósforo total (%)	0,52	0,52	0,52	0,52
Fósforo disponível (%)	0,30	0,30	0,30	0,30
Sódio (%)	0,20	0,20	0,20	0,20
Lisina digestível (%)	0,96	0,96	0,96	0,96
Metionina+Cistina digestível (%)	0,57	0,57	0,57	0,57
Treonina digestível (%)	0,63	0,63	0,63	0,63
Triptofano digestível (%)	0,17	0,17	0,17	0,17
Colina (mg/kg)	200	200	200	200

¹Composição por kg de ração: 0,008g de ferro; 0,0012g de cobre; 0,004g de manganês; 0,01g de zinco; 0,01mg de cobalto; 0,01mg de iodo.

²Composição por kg de produto: 7800.00UI de vitamina A; 2150.000UI de vitamina D₃; 25760UI de vitamina E; 4000mg de vitamina K; 7320mg de vitamina B₂; 1560mg de vitamina B₆; 30.000mcg de vitamina B₁₂; 19,7 mg de ácido pantotênico; 13,13g de niacina; 43mg de biotina; 765mg de ácido fólico; 250mg de selênio; 5000mg de antioxidante.

³Caulin

Tabela 2 - Composição química analisada das rações experimentais na matéria natural

Ingredientes	Tratamentos			
	3200 EM	3200 EM+P	3300 EM	3300 EM+P
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.950	3.950	4.040	4.040
Proteína bruta (%)	18,48	18,81	16,95	16,64
Extrato etéreo (%)	4,66	4,66	5,73	6,05
Fibra bruta (%)	6,68	6,72	6,07	5,65
Fibra em detergente neutro (%)	11,22	11,22	10,62	10,62
Fibra em detergente ácido (%)	6,08	6,08	6,25	6,24
Matéria mineral (%)	5,20	5,32	4,43	4,52
Cálcio (%)	0,71	0,74	0,70	0,70
Fósforo total (%)	0,56	0,56	0,54	0,54

As análises de matéria seca (MS), umidade (UM), energia bruta (EB), proteína bruta (PB = N x 6,25), extrato etéreo (EE) das rações e fezes foram realizadas no laboratório CBO assim como as análises de MS, UM, EB e PB da urina. As análises de fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), matéria mineral (MM), cálcio (Ca) e fósforo (P), foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, de acordo com os métodos descritos por INCT-CA (2012).

Os valores de energia digestível (ED), energia metabolizável (EM), energia metabolizável corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMn), proteína bruta digestível (PD), extrato etéreo digestível (EED), fibra bruta digestível (FD), fibra em detergente neutro digestível (FDND), fibra em detergente ácido digestível (FDAD), matéria mineral digestível (MMD), cálcio digestível (CaD) e fósforo digestível (PPD) das rações foram determinados pelas equações descritas por Matterson (1965) e Diggs *et al.* (1965) para correção do balanço de nitrogênio da energia metabolizável, utilizando a constante de 5,45 kcal por grama de nitrogênio na urina.

Onde:

$$ED = \frac{EB \text{ ingerida} - EB \text{ excreta fezes}}{MS \text{ ingerida}} \times 100$$

MS ingerida

$$EM = \frac{EB \text{ ingerida} - EB \text{ excreta fezes} - EB \text{ excreta urina}}{MS \text{ ingerida}} \times 100$$

MS ingerida

$$\text{EMn ra\c{c}\~ao} = \frac{\text{EB ingerida} - \text{EB excreta fezes} - \text{EB excreta urina} - 5,45 \text{ BN}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{PD} = \frac{\text{PB ingerida} - \text{PB excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{EED} = \frac{\text{EE ingerida} - \text{EE excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{FD} = \frac{\text{FB ingerida} - \text{FB excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{FDAD} = \frac{\text{FDA ingerido} - \text{FDA excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{FDND} = \frac{\text{FDN ingerido} - \text{FDA excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{MMD} = \frac{\text{Min ingeridos} - \text{Min excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{CaD} = \frac{\text{Ca ingerido} - \text{Ca excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

$$\text{PPD} = \frac{\text{P ingerido} - \text{P excreta fezes}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (Universidade Federal de Viçosa, versão 1999), seguindo o delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 2x2, considerando como efeitos principais, os níveis de energia metabolizável, a inclusão ou não de probiótico e a intera o níveis de energia metabolizável x inclusão ou não de probiótico.

As diferenças entre as m dias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls, considerando efeito significativo para $P < 0,05$.

3.5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação ($P>0,05$) entre os níveis de energia e a suplementação ou não de probiótico para nenhum dos parâmetros avaliados.

Os tratamentos com diferentes níveis de energia e/ou adição de probiótico influenciaram ($P<0,05$) os valores de ED (Tabela 3). Maior valor de ED foi determinado na ração de 3300 EM+P quando comparado aos valores determinados nas rações com 3200 EM e 3200 EM+P, e em relação ao tratamento 3300 EM não foi verificada diferença ($P>0,05$). A ração com 3300 EM apresentou valor semelhante de ED.

Tabela 3- Energia digestível (ED), Energia metabolizável (EM) e Energia metabolizável corrigida (EMn) em kcal/kg na matéria natural de suínos em crescimento alimentados com níveis de energia e probiótico.

Variáveis	Tratamentos				CV%
	3200 EM	3200 EM+P	3300 EM	3300 EM+P	
ED	3494b	3517b	3588ab	3623a	2,369
EM	3424b	3459ab	3523ab	3564a	2,745
EMn	3322b	3350b	3427ab	3466a	2,556

*a, b – médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste SNK ($P<0,05$).

Para a EM, maior valor ($P<0,05$) foi verificado para o tratamento 3300 EM+P, em comparação com a ração contendo 3200 de EM, enquanto valores intermediários foram verificados nas rações 3200 EM+P e 3300 EM. Os tratamentos 3200 EM+P e 3300 EM não diferiram ($P>0,05$) entre si, sugerindo que a inclusão de probiótico pode melhorar a eficiência de utilização da EM pelos suínos e ser viável quando reduzido o nível de energia metabolizável da dieta de 3300 para 3200 kcal/kg. Esta compensação pode ter sido proporcionada pela ação do probiótico na manutenção do equilíbrio da microbiota gastrointestinal e pela produção de enzimas exógenas por microorganismos benéficos, como lactobacilos e o próprio probiótico, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, melhorando a digestão dos nutrientes. Assim como resultados encontrados por Silva (2008), quando trabalhou com adição de *Bacillus subtilis* para frangos de corte e observou aumento, em média, dos valores energéticos de 92kcal de EM/kg.

O melhor resultado encontrado para aves em relação ao presente experimento com suínos, possivelmente se deve ao menor aproveitamento da EMn das dietas a base de milho e soja, que é aproximadamente 28% a menos quando comparados aos suínos (NRC, 1994, 1998). Esta limitação das aves é devido à fração de carboidratos dos ingredientes (CHOCT *et al.*, 2010) e a falta da atividade endógena da α -1,6 galactosidase (PERRYMAN & DOZIER,

2012), e ao adicionar microorganismos probióticos que produzem enzimas, estes proporcionam para as aves uma digestibilidade mais acentuada dos nutrientes.

O valor de EMn determinado com o uso de 3300 EM+P foi maior ($P<0,05$) aos observados nas rações com 3200 EM e 3200 EM+P, enquanto para a ração com 3300 EM os valores determinados foram semelhantes.

Os coeficientes de metabolizabilidade relacionam os valores de energia metabolizável com os de energia bruta, sendo que quanto melhor a utilização da energia pelos animais maiores são os coeficientes (HENZ *et al.*, 2013). Porém, no presente estudo, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) no CDE e CME entre os diferentes níveis de energia e uso de probiótico ou não nas rações para suínos (Tabela 4).

Entretanto, nas rações com 3200 EM+P e 3300 EM+P verificou-se, em valores absolutos, aumento médio de 1,04 e 1,16%, respectivamente, nos valores de CME. Estes resultados estão de acordo com Huaynate *et al.* (2008), que também não verificaram diferenças no CDE e no CME de suínos suplementados com probiótico, entretanto, em valores absolutos, os autores verificaram aumento de 1,54% no CDE e de 1,73% no CME, com a suplementação de probiótico na ração. Segundo os autores, o favorecimento da digestibilidade da energia em valores absolutos foi devido à produção de amilases, proteases e lipases pelos microorganismos probióticos. De forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, Yu *et al.* (2008), em pesquisa com *Lactobacillus fermentum* também não encontraram diferenças na digestibilidade da energia para suínos recém desmamados.

Tabela 4- Coeficiente de Digestibilidade de Energia (CDE) e Metabolizabilidade da Energia (CME)

Variáveis	Tratamentos				CV%
	3200 EM	3200 EM+P	3300 EM	3300 EM+P	
CDE (%)	88,46	89,04	88,82	89,69	2,37
CME (%)	86,69	87,57	87,19	88,21	2,74

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nos percentuais de FDND, CaD e PPD entre os tratamentos (Tabela 5). O que não era o esperado, pois de acordo com resultados encontrados por Huaynate *et al.* (2006), a produção de ácidos graxos pela microbiota intestinal, como os *Lactobacillus*, reduz substancialmente o pH intestinal e favorece a presença do cálcio na forma ionizada, o que proporciona sua maior absorção pelo intestino. Li *et al.* (2008) verificaram aumento da digestibilidade ileal de cálcio com a utilização de probiótico para frangos de 21 a 42 dias. Os resultados encontrados no presente experimento

diferem dos obtidos por Huaynate (2008), o qual observou que a adição de probióticos na ração aumentou a digestibilidade da matéria mineral em 7,83%.

Tabela 5- Percentuais (%) de nutrientes digestíveis na matéria seca para suínos em crescimento alimentados com níveis de energia e probiótico.

Variáveis	Tratamentos				CV%
	3200 EM	3200 EM+P	3300 EM	3300 EM+P	
PD	18,26a	18,68a	16,44b	16,37b	3,11
EED	3,05c	3,22c	4,28b	4,89a	11,10
FD	4,88a	5,02a	4,35b	4,15b	9,84
FDND	9,37	10,05	9,07	9,35	8,29
FDAD	4,21b	4,28b	4,75a	4,89a	9,12
MMD	3,14ab	3,50a	2,69b	2,85ab	16,42
CaD	0,34	0,41	0,39	0,37	22,46
PPD	0,43	0,44	0,42	0,45	9,01

*PD= Proteína bruta digestível; EED= Extrato etéreo digestível; FD = Fibra bruta digestível; FDND = Fibra em detergente neutro digestível; FDAD = Fibra em detergente ácido digestível; MMD = Matéria mineral digestível, CaD = Cálcio digestível; PPD = Fósforo digestível.

**a, b, c – médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste SNK (P<0,05).

As rações com 3300 EM e 3300 EM+P apresentaram menores percentuais (P<0,05) de PD e FD quando comparadas às rações com 3200 EM e 3200 EM+P (Tabela 5). Os valores estão de acordo com as rações formuladas uma vez que para o aumento de energia de 3200 para 3300 de EM fez-se a inclusão de óleo, alterando-se assim o percentual dos demais nutrientes nas dietas.

Maior valor de EED (P<0,05) foi observado na ração com 3300 EM+P, quando comparado aos demais tratamentos. As rações com 3200 EM e 3200 EM+P apresentaram menores valores de EED quando comparadas com as rações com 3300 EM e 3300 EM+P. Os valores observados são justificados pelo aumento de energia de 3200 para 3300 EM pela inclusão de óleo, pois o óleo de soja apresenta valores elevados de energia digestível (8600 kcal/kg) e de energia metabolizável (8300 kcal/kg) para suínos (ROSTAGNO *et al.*, 2011).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Meng *et al.* (2010), que verificaram aumento na digestibilidade de nitrogênio (N) e energia com adição de probiótico em rações com 3500kcal/kg de EM para suínos em crescimento. De acordo com os autores, o equilíbrio da microflora pode melhorar a conversão dos nutrientes em deposição de proteína, e, conseqüentemente, aumentar o metabolismo total de energia e de nutrientes. Para suínos com 5 semanas pós desmame, os aumentos da digestibilidade ileal da matéria seca, N e energia foram de 2,8%, 5,27% e 2,59% respectivamente; e para suínos após 10 semanas do desmame, 4,62%, 2,32% e 2,49%, respectivamente.

As rações com 3300 EM e 3300 EM+P apresentaram maior percentual de FDAD ($P<0,05$) em comparação às rações com 3200 EM e 3200 EM+P. Óleos e gorduras contribuem na dieta animal com outras funções além do seu alto valor calórico. Eles podem melhorar a utilização da energia e a digestibilidade de outros componentes das rações por meio de inibidores do esvaziamento gástrico, como a colecistoquinina que resulta numa redução da taxa de passagem dos alimentos e, portanto, melhoram sua utilização (URBANO, 2006). Outro mecanismo é o sinergismo entre ácidos graxos saturados e insaturados, em que a formação de micelas e a absorção de gordura total da dieta são melhoradas. Produzem um menor incremento calórico no metabolismo, fornecendo para os animais energia para manutenção e produção, resultando em maior utilização da energia líquida para seu crescimento (BAIÃO & LARA, 2005).

A restrição alimentar ou níveis sub-ótimos de nutrientes induzem a modulações no trato gastrointestinal e respectiva melhora no aproveitamento dos alimentos (PALO *et al.*, 1995; CHIBA *et al.*, 1999, 2002). Em relação ao metabolismo, a restrição induz ao aumento da eficiência da síntese protéica pela redução da oxidação dos aminoácidos (REEDS *et al.*, 1981; FABIAN *et al.*, 2003). Palo *et al.* (1995) ao submeter frangos à restrição alimentar de 7 dias encontraram alterações transitórias nos órgãos e na atividade das enzimas digestivas, sugerindo uma adaptação funcional a restrição alimentar. Porém, Sartor *et al.* (2006) ao trabalharem com suínos, não encontraram diferença na digestibilidade dos nutrientes e metabolizabilidade da energia fazendo redução de 20% do consumo calculado de acordo com o peso metabólico, o pouco tempo e a baixa intensidade da restrição realizada podem não ter sido suficientes para alterara digestibilidade da dieta.

Foi observado maior valor ($P<0,05$) para MMD na ração com 3200 EM+P quando comparado ao uso da ração com 3300 EM. É possível que as diferenças nos valores de MMD observadas estejam relacionadas à inclusão do ingrediente inerte (caulim), uma vez que este apresenta sílica em sua composição.

Para os coeficientes de digestibilidade de proteína bruta (CDPB), de fibra bruta (CDFB), fibra em detergente neutro (CDFDN), matéria mineral (CDMM), cálcio (CDCa) e fósforo (CDPP) não foram observadas diferenças ($P<0,05$) entre os tratamentos (Tabela 6). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Giang *et al.* (2010), que não encontraram diferenças nos coeficientes de digestibilidade da proteína bruta, matéria orgânica e fibra bruta em suínos de 3 a 5 semanas após o desmame.

De forma semelhante, Huaynate *et al.* (2006), também não verificaram diferenças na ED, EM, no coeficiente de digestibilidade da energia bruta e no coeficiente de

metabolizabilidade da energia bruta, com a adição de probióticos a base de bactérias ácido lácticas na ração de suínos. Wang *et al.* (2009), também não encontraram efeito na digestibilidade da matéria seca e nitrogênio para suínos em crescimento suplementados com *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*.

Em estudo anterior, com bactérias do gênero *Bacillus*, Kornegay & Risley (1996) também não encontraram efeito na digestibilidade da MS, FDN, FDA, MM e nitrogênio em suínos em terminação, mesmo o probiótico tendo aumentando o número de bactérias ácido-láticas, favorecendo dessa forma o equilíbrio da microbiota. Este aumento no número de bactérias ácido-láticas é possivelmente causado pelo consumo do oxigênio livre pelo metabolismo anaeróbico facultativo dos *Bacillus subtilis*, que favorece o crescimento de *Lactobacillus spp.* (HOSOI *et al.*, 2000).

Giang *et al.* (2011), verificaram menor contagem de *E.coli* e maior número de bactéria ácido-láticas nas fezes de suínos em crescimento suplementados com *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces boulardii*, indicando que pode ter havido melhor balanço microbiano o qual favoreceu para melhor digestibilidade encontrada da PB, MO e FB, justificada pelos autores pela produção de enzimas pelos *Bacillus* e produção de substâncias antimicrobianas pelas bactérias do gênero *Saccharomyces*.

Tabela 6- Coeficientes de digestibilidade dos nutrientes para suínos em crescimento alimentados com níveis de energia e probiótico.

Variáveis	Tratamentos				CV%
	3200 EM	3200 EM+P	3300 EM	3300 EM+P	
CDPB (%)	88,04	88,50	87,11	88,50	3,15
CDEE (%)	58,28b	61,66b	67,13ab	72,64a	11,32
CDFB (%)	72,16	74,61	71,66	73,53	9,71
CDFDN (%)	74,47	79,88	76,67	79,16	8,15
CDFDA (%)	69,20b	70,40b	76,08ab	78,96a	9,01
CDMM (%)	53,74	58,60	54,56	57,63	16,78
CDCa (%)	42,91	49,90	50,48	47,58	22,47
CDP (%)	68,47	70,70	69,58	71,32	9,28

*CDPB = Coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEE = Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDFB = Coeficiente de digestibilidade da fibra bruta; CDFDN = Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CDFDA = Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido; CDMM = Coeficiente de digestibilidade da matéria mineral, CDCa = Coeficiente de digestibilidade do cálcio; CDP = Coeficiente de digestibilidade do fósforo; CDMM = Coeficiente de digestibilidade da matéria mineral.

**a, b – médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Os resultados do presente estudo contrastam com Silveira *et al.* (2007), que verificaram maior coeficiente de digestibilidade da proteína em suínos que receberam rações suplementadas com probiótico.

O CDEE da ração de 3200 EM não diferiu da ração de 3300 EM, mostrando que a inclusão de óleo para o aumento de energia da ração, não aumentou o CDEE, eliminando o possível efeito extra calórico do óleo. Porém, com a inclusão de probiótico à ração de 3300 EM, observa-se a diferença entre os tratamentos de 3200 EM e 3200 EM+P, evidenciando assim o efeito benéfico deste aditivo na digestibilidade do extrato etéreo. Foram verificados aumentos de 5,80% e 8,22% nos coeficientes de digestibilidade do extrato etéreo quando comparadas as rações com 3200 EM x 3200 EM+P e 3300 EM x 3300 EM+P, respectivamente.

A diferença verificada no CDEE no presente estudo pode ser atribuída à produção de lipases pelos microrganismos probióticos adicionados à ração, conforme justificado por Huaynate *et al.* (2006). Robles *et al.* (2003), também verificaram que a inclusão de probiótico na ração melhorou em 2,04% a digestibilidade do extrato etéreo. Além da produção de lipase pelos microrganismos probióticos, a melhora na digestibilidade do extrato etéreo verificada entre os estudos também pode estar relacionada à produção de substâncias surfactantes pelas bactérias probióticas que agem como emulsificantes da gordura, reduzindo a tensão superficial e aumentando a superfície de contato para a atuação das enzimas produzidas pelos enterócitos e pela própria microbiota (SILVA, 2011).

As bactérias do gênero *Bacillus* são descritas na literatura como grandes produtoras de biosurfactantes (MULLIGAN, 2005). O *Bacillus subtilis* e o *Bacillus licheniformis* são produtores de lipopeptídeos, glicolipídeos e lipoproteínas (MUKHERJEE *et al.*, 2006) como a surfactina (BARROS *et al.*, 2007) e a liquesina (DE GUSMÃO *et al.*, 2010), respectivamente. Os biosurfactantes são metabólitos ativos em superfície produzidos por microorganismos crescendo em compostos hidrossolúveis ou óleo. Essas moléculas possuem a propriedade característica de reduzir as tensões interfaciais ar-água e óleo-água e a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos (DE GUSMÃO *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2011). A tensão diminui quando a concentração de surfactante do meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (DE GUSMÃO *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2011).

Há também o efeito da adição de óleo para aumento da energia metabolizável de 3200 para 3300 kcal/kg, que aumenta o tempo de permanência do alimento no trato gastrointestinal, pelo estímulo para produção e liberação de colecistoquinina (DONZELE *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2007), a qual retarda o esvaziamento gástrico, havendo assim, maior tempo para atuação das enzimas digestivas. Entretanto, a diferença percentual de 5,80% encontrada

entre as rações com 3200EM e 3200EM+P e de 8,22% entre as rações 3300EM e 3300EM+P, foi devida a adição de probiótico, já que os tratamentos continham o mesmo nível de energia.

Maior coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido (CDFDA) ($P < 0,05$) foi determinado com o uso da ração com 3300 EM+P, comparado à ração com 3200 EM, enquanto os CDFDA obtidos nos demais tratamentos (3200 EM+P e 3300 EM) apresentaram valores intermediários, os quais foram semelhantes aos demais tratamentos (Tabela 6).

Tabela 7- Diferenças numéricas e percentuais nos valores de energia e dos nutrientes entre os tratamentos 3200 kcal de EM/kg+probiótico e 3200kcalde EM/kg.

Variáveis	Tratamentos		Diferença	Diferença %
	3200 EM	3200 EM+P		
ED (Kcal/Kg)	3494	3517	23	0,66
EM (Kcal/Kg)	3424	3459	35	1,02
EMn (Kcal/Kg)	3322	3350	28	0,84
PD (%)	18,26	18,68	0,42	2,32
EED (%)	3,05	3,22	0,18	5,77
FD (%)	4,83	5,02	0,19	3,89
FDND (%)	9,37	10,05	0,68	7,25
FDAD (%)	4,21	4,28	0,07	1,71
MMD (%)	3,14	3,50	0,36	11,54
CaD (%)	0,34	0,41	0,07	21,05
PPD (%)	0,43	0,44	0,01	3,26
CDED (%)	88,46	89,04	0,58	0,66
CDEM (%)	86,69	87,57	0,88	1,02
CDPB (%)	88,04	88,50	0,47	0,53
CDEE (%)	58,28	61,66	3,38	5,80
CDFB (%)	72,16	74,61	2,45	3,39
CDFDN (%)	74,47	79,88	5,41	7,26
CDFDA (%)	69,20	70,40	1,20	1,73
CDMM (%)	53,74	58,60	4,86	9,05
CDCa (%)	42,91	49,90	7,00	16,31
CDP (%)	68,47	70,70	2,22	3,25

ED = energia digestível; EM = energia metabolizável; EMn = energia metabolizável corrigida para balanço de nitrogênio; PD = proteína bruta digestível; EED = extrato etéreo digestível; FD = fibra bruta digestível; FDND = fibra em detergente neutro digestível; FDAD = fibra em detergente ácido digestível; MMD = matéria mineral digestível; CaD = cálcio digestível; PPD = fósforo digestível; CDED = coeficiente de digestibilidade da energia; CDEM = coeficiente de digestibilidade da energia metabolizável; CDPB = coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEE = coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDFB = coeficiente de digestibilidade da fibra bruta; CDFDN = coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CDFDA = coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido; CDMM = coeficiente da matéria mineral; CDCa = coeficiente de digestibilidade do cálcio; CDP = coeficiente de digestibilidade do fósforo.

No presente estudo, os animais suplementados com probiótico digeriram melhor os nutrientes da ração em relação àqueles que consumiram as rações sem suplementação de probiótico, exceto para FDA, demonstrando que a suplementação de probiótico na ração pode ter auxiliado na digestão e/ou na absorção desses nutrientes. Essa inferência está de acordo com as observações de Huaynate (2008), que verificaram aumento de 2,99% no CDPB, 2,59% no CDFDN e 2,98% no CDFDA para suínos.

Tabela 8- Diferenças numéricas e percentuais nos valores de energia e dos nutrientes entre os tratamentos 3300kcal/kg+probiótico e 3300kcal/kg.

Variáveis	Tratamentos		Diferença	Diferença %
	3300 EM	3300 EM+P		
ED (Kcal/Kg)	3588	3623	35	0,98
EM (Kcal/Kg)	3523	3564	41	1,16
EMn (Kcal/Kg)	3427	3466	39	1,14
PD (%)	16,44	16,37	-0,07	-0,41
EED (%)	4,28	4,89	0,60	14,08
FD (%)	4,35	4,15	-0,20	-4,48
FDND (%)	9,07	9,35	0,28	3,12
FDAD (%)	4,75	4,93	0,17	3,62
MMD (%)	2,69	2,90	0,21	7,66
CaD (%)	0,39	0,37	-0,02	-5,85
PPD (%)	0,42	0,45	0,03	7,18
CDED (%)	88,82	89,69	0,88	0,99
CDEM (%)	87,19	88,21	1,01	1,16
CDPB (%)	87,11	88,50	1,38	1,59
CDEE (%)	67,13	72,64	5,52	8,22
CDFB (%)	71,66	73,53	1,87	2,62
CDFDN (%)	76,67	79,16	2,49	3,25
CDFDA (%)	76,08	78,96	2,87	3,78
CDMM (%)	54,56	57,64	3,08	5,64
CDCa (%)	50,48	47,58	-2,90	-5,75
CDP (%)	69,58	72,02	2,43	3,50

ED = energia digestível; EM = energia metabolizável; EMn = energia metabolizável corrigida para balanço de nitrogênio; PD = proteína bruta digestível; EED = extrato etéreo digestível; FD = fibra bruta digestível; FDND = fibra em detergente neutro digestível; FDAD = fibra em detergente ácido digestível; MMD = matéria mineral digestível; CaD = cálcio digestível; PPD = fósforo digestível; CDED = coeficiente de digestibilidade da energia; CDEM = coeficiente de digestibilidade da energia metabolizável; CDPB = coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEE = coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDFB = coeficiente de digestibilidade da fibra bruta; CDFDN = coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CDFDA = coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido; CDMM = coeficiente da matéria mineral; CDCa = coeficiente de digestibilidade do cálcio; CDP = coeficiente de digestibilidade do fósforo.

Os coeficientes de digestibilidade encontrados estão condizentes com os calculados de acordo com a inclusão de milho e farelo de soja nas rações 3200 e 3300 de EM/kg e as tabelas brasileiras para aves e suínos que seriam de 68,10 e 67,26 para FDA e, 67,97 e 67,15 para FDN, respectivamente.

Conforme observado, a adição de probiótico a base de bactérias do gênero *Bacillus* na ração contendo 3200 kcal de EM/kg não houve diferença nos valores de ED, EM, EMn e coeficientes de digestibilidade dos nutrientes avaliados (Tabela 7). Já com a adição de probiótico na ração com 3300 kcal de EM/kg, obteve-se melhoria na digestibilidade da fibra em detergente ácido e do extrato etéreo, este incremento resultou no aumento de 1,16% da energia metabolizável (Tabela 8).

CONCLUSÃO

A inclusão do probiótico melhorou o coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo em 5,56% e da fibra em detergente ácido em 3,62% aumentando a digestibilidade da energia em 1,16% para rações com 3300 kcal de EM/kg.

REFERÊNCIAS

- ABIPECS 2012. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatoriosassociados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf> Acesso em 20 de jun de 2014.
- Almeida, E.C., Fialho, E.T., Cantarelli, V.S., Zangeronimo, M.G., Pereira, R.A.N., Rodrigues, P.B. Digestibilidade ileal e perdas endógenas de aminoácidos de dietas com óleo de soja para suínos em crescimento. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.4, p.1045-1051, 2007.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M.E., Stanton, C., 2002. **Joint FAO/WHO. Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario. Disponível em <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>> Acesso em 25 de jun 2014.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, 307, 1915-1920.
- Baião N.C; Lara L.J.C. Oil and fat in broiler nutrition. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.7, n.3, 2005.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Henriques, A.O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71, 968-978, 2005.

Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Júnior, M.R., Pastore, G.M. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos**. São Paulo: Química Nova, v.30, n.2., p. 409-414, 2007.

Chaud, L.C.S., Vaz, P., Felipe, M.G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v.4, n.1-2, p. 87-97, 2007.

Chiba, L.I. et al. Growth performance and carcass traits of pigs subjected to marginal dietary restrictions during the growerphase. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1769-1776, 1999.

Chiba, L.I., Kuhlert, D.L., Frobish, L. T., Jung, S.B., Huff-Lonergan, E.J., Lonergan, S.M., Cummins, K.A. Effect of dietary restrictions on growth performance and carcass quality of pigs selected for lean growth efficiency. **Livestock Production Science**, v.74, p. 93-102, 2002.

Choct, M., Dersjant-Li, Y., McLeish, J., Peisker, M. Soyoligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: A review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian-australas. J. Anim. Sci.** v.10, p. 1386-1398, 2010.

Cutting, S.M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p. 214-220, 2011.

De Gusmão, C.A.B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A.,. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP 1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World J. Microbiology Biotechnology**, v.26, p.1683-1692, 2010.

Delia, E.V., Piu, T., Lekaj, P., Tafaj, M. Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. **Livestock Science**, v.134, p.249-251, 2010.

Deng, J., Li, Y., Zhang, J., Yang, Q. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 62-68, 2013.

INCT-CA - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (2012). Métodos para análise de alimentos. Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C. et al. (Eds.) Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

Diggs, B.G., Becker, D.E., Jensen, A.H., Norton, H.W. Energy value of various feeds of young pig. **J. Anim. Sci.**, v.24, n.2, p.555-558, 1965.

Diretiva 1831/2003/EC (UE, 2008). Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf. Acesso em 24 de set de 2014.

Donzele, J.L., Silva, F.C.O., Ferreira, A.S., Freitas, R.T.F., Kill, J.L. Digestibilidade e Metabolizabilidade da Energia de Rações com Diferentes Níveis de Óleo de Soja para Suínos. **R. Bras. Zootec.**, v.27, n.5, p.922-927, 1998.

Fabian, J. et al., 2003. Growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. **Journal of Animal Science**, 81, 1142-1149.

Flemming, J.S. & Freitas, R.J.S. Avaliação do efeito de prebiótico (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n2, p. 41-47, 2005.

Food and Agriculture Organization of The United Nations; World Health Organization. **Guidelines for the evaluations of probiotics in food**. London: FAO/WHO 2002. Working Group Report.

Furlan, R.L., Macari, M., Luquetti, B.C., 2004. **Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva**. Em 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição. Anais... – Balneário Camboriú, SC.

Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 15-28, 2010.

Giang, H.H., Viet, T.Q., Ogle, B., Lindberg, J.E. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. **Livestock Science**, v. 129, p. 95-103, 2010.

Giang, H.H., Viet, T.Q., Ogle, B., Lindberg, J.E., 2011. Effects of Supplementation of Probiotics on the Performance, Nutrient Digestibility and Faecal Microflora in Growing-finishing Pigs. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v. 24, nº 5, 655- 661

Giang, H.H., Viet, T.Q., Ogle, B., Lindberg, J.E. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. **Livestock Science**, v. 143, p. 132-14, 2012.

Gill, H.S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 755–773, 2003.

Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., Silva, R. **Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial**. Quim.Nova, v. 30, nº. 1, p. 136-145, 2007.

Harwood, C.R. & Cranenburgh, R., 2007. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. **Trends in Microbiology**, v.16, n.2, doi:10.1016/j.tim.2007.12.001.

Hammes, W.P., Hertel, C. **The Genera Lactobacillus and Carnobacterium**. In: Dworkin, M., Hansen, P.A., Lessel, E.F. (Eds.), *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer-Verlag, New York, 2007.

Henz, J.R., Nunes, R.V., Pozza, P.C., Furlan, A.C., Scherer, C., Eyng, C., Silva, W.T.M. Valores energéticos de diferentes cultivares de milho para aves. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.5, p.2403-2414, 2013.

Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.283–307, 2002.

Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S., 2000. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. **Canadian Journal of Microbiology**, 46, 892-897.

Huaynate, R.A.R., Thomaz, M.C., Kronka, R.N., Fraga, A.L., Scandolera, A.J., Budiño, F.E.L. Uso de probiótico em dietas de suínos: incidência de diarreia, desempenho zootécnico e digestibilidade de rações. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.43, n.5, p.664-673, 2006.

Huaynate, R.A.R. **Probióticos em dietas de suínos**. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Campus Jaboticabal.

Ibrahim, S.E., Amin, H.B.E., Hassan, E.N. Sulieman, A.M.E. Amylase Production on solid State Fermentation by *Bacillus* Spp. **Food and Public Health**, v.2, n.1, 30-35. Doi:10.5923/j.fph.20120201.06, 2012.

Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., Chang, C.S.,. Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. **Process Biochemistry**, v.39, p.1441-1447, 2004.

Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p.1-9, 2002.

Kornegay, E.T & Risley, C.R. Nutrient digestibilities of a corn-soybean meal diet as influenced by *Bacillus* products fed to finishing swine. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.799-805, 1996.

Lambert, G.P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. **J. Anim. Sci.**, v.87, p.101-108, 2009.

Lange, C.F.M, 2010. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**, v.134, n.1, p. 124-134.

Li, M. Evaluation of QIAmp DNA mini stoll kit for microbial ecological studies. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, n.1, p. 13-20, 2003.

Li, L.L., Hou, Z.P., Li, T.J., Wu, G.Y., Huang, R.L., Tang, Z.R., Yang, C.B., Gong, J., Yu, H., Kong, X.F. Effects of dietary probiotic supplementation on ileal digestibility of nutrients and growth performance in 1- to 42-day-old broilers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.35-42, 2008.

Lovatto, P.A., 2002. **Nutrição e alimentação, Suinocultura geral**. Cap. 05, p.63-83. Disponível em: http://w3.ufsm.br/suinos/CAP5_alim.pdf Acesso em 24 de jun. de 2014.

Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, A.S., Abdel- Fattah, A.F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresour. Technol.**, v.69, p.155-9, 1999.

Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., Bacterial diversity in the human gut. **Advances in Applied Microbiology**, v.54, p. 261-289, 2004.

Maiorka, A., 2004. **Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola**. Em V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Anais... – Chapecó, SC – Brasil.

- Matterson, L.D., Potter, L.M., Stutz, N.W. **The metabolizable energy of feeds ingredient for chickens.** Storrs. University of Connecticut - Agricultural Experiment Station.11p. (Research Report, 7), 1965.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., Kasper, D.. A microbial symbiosis factor prevents inflammatory disease. **Nature**, v.453, p.620–625, 2008.
- Meng, Q.W., Yan, L., Ao, X., Zhou, T.X., Wang, J.P., Lee, J.H., Kim, I.H., 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growth growing-finishing pigs. **J. Anim Sci.**, 88, 3320-3326. doi: 10.2527/jas.2009-2308.
- Mukherjee, A.K. e Das, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* in a particular habitat. **FEMS Microbiol Ecol.**, v.54, p.479-489, 2005.
- Mulligam, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183-198, 2005.
- Nicholson, W.J., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64, 548-572.
- NRC, 1994.Nutrient Requirements of Poultry.9th ed. Natl. Acad.Press, Washington, DC.
- NRC, 1998.Nutrient Requirements of Swine.10th rev. ed. Natl.Acad. Press, Washington, DC.
- Ohh, S.J. Meta analysis to draw the appropriate regimen of enzyme and probiotic supplementation to pigs and chicken diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.24, n. 4, p73-86, 2011.
- Oliveira, L. T., Batista, S. M. M. A atuação dos probióticos na resposta imunológica. **Revista Brasileira de Nutrição**, v.19, nº3 p. 1-4, 2003.
- Palo, P.E., Sell., J.L., Piquer, F.J., Vilaseca, L., Soto-Salanova, M.F. Effect of early nutrient restriction on broiler chickens. 2. Performance and digestive enzyme activities.**Poultry Sci.**, 74, 1470-83, 1995.
- Patel, R. M.; Singh, S. P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and Optimization. **Process Biochemistry**, v.40, p.3569-3575, 2005.
- Pekas, J.C. Versatile swine laboratory apparatus for physiologic and metabolic studies. **Journal of Animal Science**, v.27, n.5, p.1303-1309, 1968.
- Perryman, K.R & Dozier III, W.A. Apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility of low and ultra-low oligosaccharide soybean meals fed to broiler chickens. **Poultry Science**, v.91, p.2556-2563, 2012.
- Quigley, E.M.M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological research**, v.61, p.213-218, 2010.

Reeds, P.J. et al, 1981. Effect of changes in the intakes of protein and non - protein energy on whole - body protein turnover in growing pigs. **British Journal Nutrition**, 45, 539-546.

Richards, J.D., Gong, J. Lange, C.F.M. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, p.421-435, 2005.

Robles, R.A.H., Thomaz, M.C., Kronka, R.N., Scandolera, A.J., Fraga, A.L., Budiño, F.E.L. Consumo de ração e digestibilidade das dietas com e sem probiótico para suínos em crescimento, 2003.

Ross, G.R. et al. Effects of probiotic administration in swine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, n.6, p.545-549, 2010.

Rostagno H.S., Albino L.F.T., Donzele J.L., Gomes P.C., Oliveira R.F., Lopes D.C.; Ferreira A.S., Barreto S.L.T., Euclides R.F., 2011. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. Editora UFV, Viçosa-MG, Brasil.

Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R.M., Teixeira, J.A.C., Campos-Takaki, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potencial of biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5, 2011.

Saad, S.M.I., Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.

SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Versão 1999. Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., Bevins, C.L.,. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. **Nature**, v.422, p.522–526, 2003.

Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A., 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.101-110.

Santos, R.B., Barbosa, L.P.J.L., Barbosa, F.H.F., 2011. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v.1, n.2, ISSN 2179-9563. Ano

Sartor, C., Hauschild, L., Carvalho, A.D., Garcia, G.G., Kunrath, M.A., Lovatto, P. A., 2006. Digestibilidade aparente da dieta e balanço do nitrogênio em suínos de diferentes grupos genéticos com ou sem restrição alimentar. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.617-623.

Schulz, D., Bonelli, R.R., Batista, C.R.V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara v.16, n.4, p.403-411, 2005.

Sen, S., Ingale, S.L., Kim, Y.W., Kim, J.S., Lohakare, J.D., Kim, E.K., Kim, H.S., Ryu, M.H., Kwon, I.K., Chae, B.J. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets

on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science**, v.93, p.264-268, 2012.

Shim, Y.H., Shinde, P.L., Choi, J.Y., Kim, J.S., Seo, D.K., Pak, J.I., Chae, B.J., Kwon, I.K. Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 23, 521-529, 2010.

Silva, C.R. **Uso de probióticos em rações para frangos de corte: desempenho, digestibilidade e energia metabolizável**. 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa.

Silva, M.A. **Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis***. 2011. 73p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Universidade Católica de Pernambuco.

Silveira, H.; Barbosa, C.E.T.; Almeida, E.C.; Pereira, L.M.; Cerqueira, L.G.S.; Souza, P.F.A, 2007. **Utilização de probiótico mais composto enzimático sobre a digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio em leitões**. In: Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos. **Anais...** Florianópolis. ABRAVES, 433-434.

Spinosa, M.R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M.R., 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Res. Microbiol.**, 151, 361-368.

Teo, A.Y. & Tan, H.M. Evaluation of the Performance and Intestinal Gut Microflora of Broilers Fed on Corn-Soy Diets Supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT)1. **J. Appl. Poult. Res.**, v.16, p.296-303, 2007.

Timmerman, H.M., Koning, C.J., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C.,. Monostrain, multistain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.219-233, 2004.

Tuohy, K.M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A.L., Gibson, G.R. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. **J. Appl. Microbiol.**, v.102, p.1026-1032, 2007.

Urbano, T. **Níveis de inclusão de óleo de soja na ração de frangos de corte criados em temperaturas termoneutra e quente**. 2006. 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Curso de Pós Graduação da Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal.

Veith, B. et al. The complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.204-211, 2004.

Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Indhumathi, J. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. **World Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.89-91, 2009.

Yu, H.F., Wang, A.N., Li, X.J., Qiao, S.Y. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.17, p.61-69, 2008.

Wang, Y., Cho, J.H., Chen, Y.J., Yoo, J.S., Huang, Y., Kim, H.J., Kim, I.H.,. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. **Livestock Science**, v.120, p.35–42, 2009.

Westers, L., Westers, H., Quax, W.J.,.Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica at BiophysicaActa**, v.1694, p.299-310, 2004.

Wong, Sui-Lan,. Advances in the use of *Bacillus subtilis*for the expression and secretion of heterologous proteins. **Current Opinion in Biotechnology**,v.6, p.517-522, 1995.