

# Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos

Fábio Enrique Lemos Budiño<sup>1</sup>, Maria Cristina Thomaz<sup>2\*</sup>, Rodolfo Nascimento Kronka<sup>2</sup>, João Martins Pizauro Júnior<sup>3</sup>, Áureo Evangelista Santana<sup>4</sup>, Fernanda Marcussi Tucci<sup>1</sup>, Alessandro Luís Fraga<sup>1</sup>, Antônio João Scandolera<sup>1</sup> e Rizal Alcides Robles Huaynate<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Zootecnia, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. <sup>3</sup>Departamento de Tecnologia, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. <sup>4</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. \*Autor para correspondência. e-mail: thomaz@fcav.unesp.br

**RESUMO.** Foram utilizados 44 leitões, desmamados aos 21 dias de idade, alimentados com cinco dietas (T1 – dieta basal; T2 – dieta basal + antibiótico; T3 – dieta basal + probiótico; T4 – dieta basal + prebiótico; T5 – dieta basal + simbiótico) e abatidos em três idades diferentes (dia do desmame, 7 e 14 dias pós-desmame). Logo após o abate, foi colhido um seguimento do intestino delgado para análise das atividades enzimáticas. Foram coletadas amostras de sangue dos leitões nos mesmos momentos pós-desmame para a análise do quadro hematológico. Os resultados demonstraram que os produtos adicionados na dieta não alteraram as atividades das enzimas de mucosa, porém foi observado aumento ( $p < 0,05$ ) nas atividades específicas da sacarase e maltase nos leitões que receberam dieta com prebiótico, entre os 7 e 14 dias pós-desmame. Os microingredientes testados não influenciaram os valores dos parâmetros sanguíneos estudados.

**Palavras-chave:** antibiótico, *Bacillus*, frutoligossacarídeo, simbiótico, suíno.

**ABSTRACT.** Influence of dietary addition of probiotic and/or prebiotic on digestive enzymes activity and blood parameters of weaned pigs. This experiment used forty-four piglets weaned at 21 days, fed with five diets (T1 – basal diet; T2 – basal diet + antibiotic; T3 – basal diet + probiotic; T4 – basal diet + prebiotic; T5 – basal diet + synbiotic) and slaughtered at three different ages (at the weaning, 7 and 14 days post-weaning). Immediately after slaughter, samples of the small intestine were collected for enzyme determination. Blood samples of the piglets were collected in the same moments after weaning for hemogram analysis. The results showed that the products added in the diet did not alter the intestinal mucosa enzymes activity; even so, an increase ( $P < 0,05$ ) was observed in the sacarase and maltase specific activity after weaning (7 and 14 days) in the piglets receiving prebiotic. The tested substances did not influence the blood parameters values studied.

**Key words:** antibiotic, *Bacillus*, fructooligosaccharide, synbiotic, swine.

## Introdução

O sistema digestivo dos leitões lactentes está preparado para digerir e absorver os nutrientes contidos no leite materno. Por ocasião do desmame, a mudança de alimento, a forma física, a variação na proporção dos nutrientes e os fatores estressantes ocasionam mudanças funcionais e estruturais dos órgãos que compõem o referido sistema (Soto, 1999). Em resposta a essas modificações, ocorre redução no desempenho, normalmente associada a alterações histológicas e bioquímicas no intestino delgado, como atrofia dos vilos e hiperplasia das criptas e, conseqüentemente, redução na capacidade de digerir e absorver nutrientes da dieta (Pluske *et al.*, 1997).

A ingestão adequada de ração, bem como a

utilização de promotores de crescimento ou nutrientes específicos fornecidos através da alimentação dos leitões, podem possibilitar a manutenção da capacidade de digestão e da absorção por intermédio do epitélio intestinal.

Recentemente, microingredientes como probióticos e prebióticos têm sido testados como alternativa ao uso de quimioterápicos. Os probióticos são suplementos microbianos vivos formados por bactérias ou fungos específicos, capazes de melhorar o equilíbrio microbiano no intestino, uma vez que promovem a redução de agentes patogênicos e estimulam o sistema imune do hospedeiro (Walker e Duffy, 1998). Os prebióticos são compostos presentes nos ingredientes da dieta e/ou adicionados a ela, não-digestíveis pelo organismo animal, mas que são

seletivamente fermentados, estimulando o crescimento e/ou a atividade de um grupo restrito de bactérias que agem beneficemente no trato digestivo (Roy e Gibson, 1998). Entre os prebióticos que têm sido mais estudados como aditivos em alimentação animal estão os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). Os frutoligossacarídeos são polímeros de frutose de cadeia curta, não digestíveis, resistentes à hidrólise, alcançando o cólon intacto e fornecendo substrato para a microbiota (Roberfroid, 1996).

Os probióticos podem possuir ação na imunomodulação do hospedeiro, devido a produção de glicopeptídeos ou outros metabólitos (Chesson, 1994). Alguns gêneros de bactérias intestinais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune, produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de *interferon* (Menten, 2001). Pesquisas demonstraram que o número de leucócitos no sangue e a concentração plasmática de IgG de leitões desmamados aumentaram após a administração de *Lactobacillus acidophilus* (Pollmann *et al.*, 1980). Perdigon *et al.* (1986) também observaram alterações imunológicas quando administraram *L. acidophilus* e *S. thermophilus* para camundongos, relatando ativação na atividade de macrófagos e linfócitos nestes animais.

Os probióticos podem também produzir enzimas que melhoram a digestão dos nutrientes como, por exemplo, a produção de lactase e galactosidase que hidrolisam a lactose permitindo sua absorção (Fuller, 1989). Foi demonstrado que os probióticos promovem alguma digestão da celulose em aves e que diversas espécies de *Lactobacillus* secretam amilase, protease e lipase. Além disso, a redução do pH intestinal por bactérias lácticas proporciona maior absorção de ácidos graxos de cadeia curta (Menten, 2001).

Indiretamente, os prebióticos também podem atuar nos sistemas imune e enzimático, por promover o crescimento das populações de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*). Estas têm a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunostimulatórias e interagir com o sistema imune em vários níveis, incluindo a produção de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrófágica, a eliminação e a indução de síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial, as IgA (Silva e Nörnberg, 2003). Xu *et al.* (2003) verificaram aumento nas atividades da amilase e da protease total do intestino delgado de frangos de corte alimentados com dieta contendo 4,0g de FOS/kg de ração.

O conceito de simbiótico alia o fornecimento de microrganismos probióticos juntamente com substâncias prebióticas específicas que estimulem seu

desenvolvimento e atividade, potencializando o efeito de ambos os produtos (Menten, 2001).

Os objetivos do presente estudo foram avaliar as atividades das enzimas digestivas e os parâmetros sanguíneos em leitões recém-desmamados consumindo rações contendo probiótico e/ou prebiótico.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da FCAV-Unesp-Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Foram utilizados 44 leitões, homogêneos quanto à linhagem, grau de parentesco e peso corporal, desmamados aos 21 dias de idade com peso médio inicial de  $5,40 \pm 0,73$ kg. Os animais foram alojados em baias individuais de 2,55m<sup>2</sup> (1,50 x 1,70m), separados por divisória de grades de ferro e vedadas com placas de madeirite, para impedir o contato entre os animais. Os bebedouros eram do tipo vaso-comunicante e os comedouros do tipo semi-automático.

Os produtos testados foram: bacitracina de zinco (15%); probiótico constituído de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ( $3,2 \times 10^9$  UFC/g); prebiótico frutoligossacarídeo (FOS) e a associação de probiótico + prebiótico (simbiótico).

As dietas experimentais foram: T1 - Dieta basal; T2 - Dieta basal + Antibiótico (40 ppm); T3 - Dieta basal + Probiótico (0,13% da ração); T4 - Dieta basal + Prebiótico (0,65% da ração); T5 - Dieta basal + Simbiótico (T3+T4 - nas mesmas inclusões citadas anteriormente). A dieta experimental, formulada de modo a atender as exigências nutricionais dos animais, baseou-se nas recomendações do NRC (1998) e está apresentada na Tabela 1. A composição da dieta foi calculada a partir das tabelas de Rostagno *et al.* (2000). A ração e a água foram fornecidas à vontade.

Os microingredientes testados foram incluídos na ração em substituição ao veículo (caulim), utilizando-se uma pré-mistura em misturador do tipo Y. O suplemento mineral e vitamínico utilizado não continha qualquer tipo de promotor de crescimento ou antibiótico.

**Tabela 1.** Composição percentual e níveis nutricionais da dieta experimental.

Ingredientes	%
Farelo de soja	26,60
Milho	48,71
Produto lácteo*	20,00
Fosfato bicálcico	1,20
Calcário calcítico	0,85
Veículo	2,00
Antioxidante	0,01
DL - Metionina 98%	0,04
L - Lisina HCl 78%	0,23
L - Treonina 98%	0,06
Sal comum	0,20

Suplemento min. e vit.**	0,10
TOTAL	100,00
<b>COMPOSIÇÃO CALCULADA</b>	
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.317
Lactose (%)	8,00
Proteína bruta (%)	21,1
Lisina (%)	1,41
Metionina (%)	0,36
Treonina (%)	0,90
Triptofano (%)	0,28
Cálcio (%)	0,81
Fósforo total (%)	0,67

\*Nuklospray K10 – EM (kcal/kg) 4.025; Lactose (%) 40,0; PB (%) 26,0; Lisina (%) 1,76; Metionina (%) 0,39; Treonina (%) 1,20; Triptofano (%) 0,38; Cálcio (%) 0,50; Fósforo total (%) 0,70; \*\*Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A – 4.000 U.I.; Vit. D<sub>3</sub> – 220 U.I.; Vit. E – 22mg; Vit. K – 0,5mg; Vit. B<sub>2</sub> – 3,75mg; Vit. B<sub>12</sub> – 20 µg; Pantotenato de Cálcio – 12mg; Niacina – 20mg; Colina – 60mg; Iodo – 140 µg; Selênio – 300 µg; Manganês – 10mg; Zinco – 100mg; Cobre – 10mg; Ferro – 99mg.

#### Atividade das enzimas de mucosa

No dia do desmame (dia 0), foram abatidos 4 leitões (controle) e nos dias 7 e 14 pós-desmame foram abatidos 4 leitões de cada tratamento. Antes de serem abatidos, os animais passaram por um período de jejum alimentar de 16 horas, sem restrição de água.

Para estudo da atividade das enzimas da mucosa intestinal (dipeptidase, sacarase e maltase), foram coletadas amostras da porção média do intestino delgado, sendo congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posteriores análises, realizadas no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Tecnologia da FCAV-Unesp-Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

A atividade da dipeptidase da mucosa intestinal foi determinada usando a L-leucilglicine (LEU-GLI) como substrato, por ser uma combinação onde apenas um dos aminoácidos (leucina) reage fortemente com o L-aminoácido oxidase, transformando-se em peróxido de hidrogênio, o qual oxida a o-dianisidine que foi determinada a 530 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000 (Nicholson e Kim, 1975).

As condições padrões do ensaio foram: substrato LEU-GLI 5 µmoles em 0,5mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0; extrato enzimático da mucosa intestinal diluído em glicerol 14% e reagente L-aminoácido oxidase (LAOR), em volume final de 1,525mL. Cada 100mL do reagente LAOR continha 18 unidades de L-aminoácido oxidase; 2mg de peroxidase; 10mg de o-dianisidine; p-hidroximercuribenzoato 0,5mM em Tris-HCl 50mM, pH 8,0.

A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato enzimático da mucosa intestinal no meio de reação descrito anteriormente contendo 1,0mL do reagente LAOR e 0,5mL do substrato LEU-GLI. Após 20 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 0,74mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%, centrifugada por dois minutos em microcentrifuga SPIN I (12000rpm) a 4°C e a absorbância determinada a 530nm. Foram incubados grupos controles sem o substrato LEU-GLI para eliminar possíveis interferências do meio de reação. Também

foram incubadas concentrações conhecidas de leucina para construção da curva padrão utilizada no cálculo da quantidade de leucina liberada pelo dipeptídeo.

As atividades da sacarase e maltase foram determinadas através da dosagem da glicose liberada na hidrólise dos substratos sacarose e maltose, respectivamente (Dahlqvist, 1964; Kidder e Manners, 1980). O substrato, diluído em tampão fosfato 0,25M, pH 6,5, contendo EDTA 6,25mM foi adicionado ao extrato enzimático e este meio de reação foi incubado a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com banho-maria em ebulição por 2 minutos, depois o meio foi centrifugado em microcentrifuga SPIN I (12000 rpm), por 2 minutos a 4°C. A dosagem da glicose liberada no meio de reação foi feita utilizando-se o “Kit Glicose Enz-Color” da Biodiagnóstica, onde 20 µL do sobrenadante obtido anteriormente foi adicionado a 2,0mL do reagente de glicose e incubado a 37°C por 10 minutos, evitando luz direta. Também foi determinada uma curva padrão de glicose com concentrações conhecidas da mesma, a qual foi utilizada no cálculo da atividade das enzimas. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 500nm. Para controle da hidrólise espontânea dos substratos foram incubados, para cada amostra, o substrato e o extrato inativado em banho-maria em ebulição.

Todas as análises foram feitas em triplicata. Porém quando foi observada entre elas variação acima de 5%, a análise foi repetida.

A unidade de atividade específica das enzimas foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisou 1 µmol de substrato por grama de proteína do tecido estudado por minuto. A proteína total do extrato bruto enzimático da mucosa intestinal foi quantificada pelo método de Hartree (1972), usando-se soroalbumina bovina como padrão.

#### Parâmetros sanguíneos

Para o monitoramento do padrão sanguíneo e da avaliação do sistema imune, foram coletadas amostras de sangue, através de punção do *sinus orbital* dos leitões ao desmame, aos 7 e 14 dias pós-desmame, sendo 2mL com anticoagulante (EDTA) para o hemograma (eritrograma, leucograma e trombograma) e 4mL sem anticoagulante para as análises de proteínas séricas totais, albumina sérica e eletroforese convencional das frações protéicas.

Através do hemograma foram determinadas as contagens globais de hemácias (10<sup>3</sup>/µL), leucócitos (µL), taxa de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), contagem diferencial dos leucócitos, estabelecendo-se as percentagens de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos, também como a contagem global de plaquetas. O hemograma foi obtido de forma automatizada com auxílio de um contador de oito parâmetros (ACT – 8, COULTER), proteínas séricas totais pelo método do Biureto e a albumina sérica

pelo método do Verde de Bromocresol.

O fracionamento eletroforético das proteínas do soro foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Sevelius e Andersson (1995) utilizando-se tampão Veronal EDTA 0,05 M, pH 8,6. As proteínas foram coradas com negro de amido e descoradas com ácido acético a 5%. A leitura do filme foi feita por densitometria (Densitômetro CELM DS35).

As frações protéicas normalmente dividem-se em albumina e frações de alfa, beta e gama globulinas. Nos suínos as frações beta e gama dificilmente separam-se, formando uma fração única (beta + gama), sendo analisadas desta forma (Kaneko, 1989).

Todos os procedimentos analítico-laboratoriais foram realizados nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV-Unesp-Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

**Delineamento experimental**

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados para controlar diferenças iniciais de peso, em esquema fatorial 5 x 2+1 (cinco dietas x duas épocas de abate + um grupo controle). A análise de variância foi realizada através do procedimento GLM do SAS (SAS® Institute, 1998), com as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Utilizou-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + E_j + (TE)_{ij} + B_k + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$Y_{ijk}$  = valor observado para a dieta i, na época de abate j, no bloco k;

$\mu$  = média geral;

$D_i$  = efeito da dieta i (i = 1, 2, 3, 4 e 5);

$E_j$  = efeito da época de abate j (j = 1 e 2);

$(TE)_{ij}$  = efeito da interação entre a dieta i e a época de abate j;

$B_k$  = efeito do bloco k (k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8);

$e_{ijk}$  = erro experimental.

**Resultados e discussão**

**Atividade das enzimas de mucosa**

Os resultados das atividades das enzimas da mucosa intestinal estão apresentados na Tabela 2. Nas Figuras 1 e 2 são apresentados graficamente os desdobramentos dos tratamentos para as variáveis sacarase e maltase, onde houve interação significativa entre os fatores.

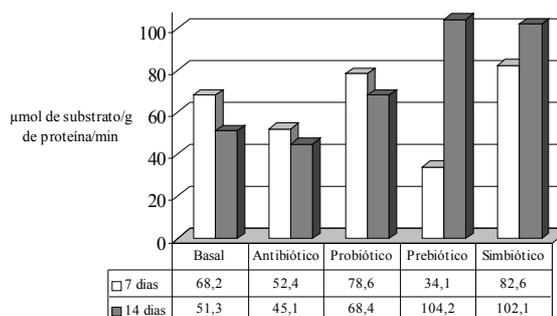
**Tabela 2.** Médias e erro padrão da média das atividades específicas da dipeptidase, sacarase e maltase ( $\mu\text{mol}$  de substrato/g de proteína/min) da mucosa intestinal dos leitões, em função do número de dias pós-desmame e das diferentes dietas.

Fatores	Dipeptidase	Sacarase <sup>1</sup>	Maltase <sup>1</sup>
Dias			
0	258,8 ± 44,5	72,9 ± 20,0	156,8 ± 29,6

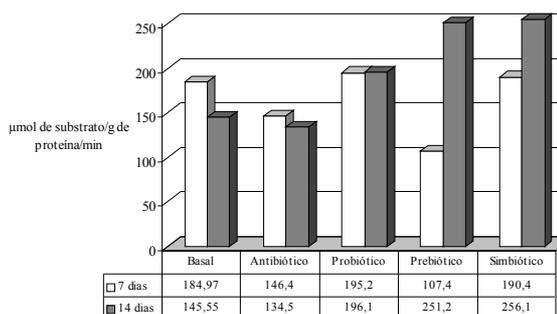
7	189,2 ± 24,1	63,2 ± 8,0	164,9 ± 14,2
14	181,1 ± 19,7	74,2 ± 12,0	196,7 ± 22,8
Teste F	NS		
Dietas			
Basal	175,0 ± 29,3	59,7 ± 9,6	165,2 ± 19,0
Antibiótico	159,3 ± 34,0	48,74 ± 9,0	140,4 ± 14,2
Probiótico	238,4 ± 44,2	73,5 ± 12,3	195,7 ± 32,2
Prebiótico	177,5 ± 36,6	69,1 ± 17,2	179,3 ± 34,7
Simbiótico	175,5 ± 27,2	92,4 ± 25,3	223,2 ± 41,4
Teste F	NS		
CV(%)	51,1	64,0	44,7

<sup>1</sup> Houve interação significativa entre os fatores; NS = não significativo.

A atividade específica da dipeptidase não foi influenciada ( $p > 0,05$ ) pelos diferentes microingredientes testados ou pela idade. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Soto (1999) que também não observou efeito da idade do animal sobre a atividade desta enzima no período de zero a 12 dias pós-desmame, e com os de Tucci (2003) que não verificou influência do prebiótico MOS (0,2%) sobre a atividade desta enzima em leitões aos 0, 7 e 14 dias pós-desmame.



**Figura 1.** Atividade da enzima sacarase de leitões aos 7 e 14 dias pós-desmame em função dos tratamentos. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste F ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Atividade da enzima maltase de leitões aos 7 e 14 dias pós-desmame em função dos tratamentos. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste F ( $P < 0,05$ ).

Em relação às enzimas sacarase e maltase pode-se observar nas Figuras 1 e 2, respectivamente, que as atividades específicas aumentaram ( $p < 0,05$ ) nos animais recebendo dieta com prebiótico, sendo maiores ( $p < 0,05$ ) aos 14 do que aos 7 dias pós-desmame. O aumento da atividade destas enzimas provavelmente se deve à presença do prebiótico FOS no lúmen intestinal. XU *et al.* (2003) verificaram aumentos das atividades das enzimas amilase e

protease total em frangos de corte alimentados com dieta contendo FOS e atribuíram estes resultados a um melhor equilíbrio da microbiota intestinal, proporcionado pela presença do FOS, levando à maior colonização de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em detrimento da presença de *E.coli*, a qual pode danificar as vilosidades intestinais e interferir negativamente na atividade enzimática.

Os resultados foram diferentes dos encontrados por Soto (1999) que não observou diferenças nas atividades da sacarase ou da maltase no período de 12 dias pós-desmame, porém foram semelhantes aos observados por Kelly *et al.* (1991) e por Tucci *et al.* (2002) que verificaram maiores atividades destas enzimas em leitões desmamados em relação somente à idade. Soto (1999) postulou que as atividades da sacarase, maltase e amilase são pouco desenvolvidas na semana seguinte ao desmame ou não apresentam alterações, atingindo depois da primeira semana, valores maiores aos encontrados nos leitões recém desmamados.

#### Parâmetros sanguíneos

Os resultados obtidos para o quadro soroprotéico incluindo proteínas séricas totais, albumina e globulinas estão apresentados na Tabela 3. Os resultados do hemograma estão apresentados na Tabela 4. Não houve interação significativa em nenhuma das análises apresentadas nestas tabelas.

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as dietas para

os parâmetros sanguíneos estudados (Tabelas 3 e 4). Todos os valores apresentaram-se normais quando comparados às tabelas de referência (Kaneko, 1989; Fraser, 1991). Valores semelhantes de hemograma foram observados por Repetti *et al.* (2003). Em relação aos dias, houve diferença significativa em todos os parâmetros, com exceção da alfa globulina, o que é normal à medida que o animal se desenvolve (Feldman *et al.*, 2000).

**Tabela 3.** Médias e erro padrão da média de proteínas séricas totais, albumina, globulinas e frações alfa e beta+gama globulinas no sangue de leitões em função do número de dias pós-desmame e das diferentes dietas.

Fatores <sup>1</sup>	Proteínas Séricas				
	Totais g/dL	Albumina g/dL	Globulinas g/dL	Alfa %	Beta+Gama %
Dias					
0	6,52 ± 0,12 <sup>AD</sup>	3,44 ± 0,07 <sup>A</sup>	3,07 ± 0,11 <sup>AB</sup>	22,4 ± 1,5	36,7 ± 1,5 <sup>AB</sup>
7	5,45 ± 0,08 <sup>C</sup>	2,71 ± 0,02 <sup>C</sup>	2,74 ± 0,08 <sup>B</sup>	22,4 ± 0,4	36,9 ± 0,5 <sup>A</sup>
14	6,05 ± 0,10 <sup>B</sup>	2,93 ± 0,03 <sup>B</sup>	3,11 ± 0,09 <sup>A</sup>	23,8 ± 0,5	33,0 ± 0,7 <sup>B</sup>
Teste F	**	**	*	NS	**
Dietas					
Basal	5,52 ± 0,11	2,74 ± 0,06	2,77 ± 0,11	22,3 ± 0,7	35,4 ± 1,2
Antibiótico	5,62 ± 0,18	2,78 ± 0,04	2,84 ± 0,14	23,4 ± 0,6	34,7 ± 1,3
Probiótico	5,88 ± 0,21	2,76 ± 0,06	3,12 ± 0,20	22,8 ± 0,9	36,9 ± 1,0
Prebiótico	5,81 ± 0,19	2,88 ± 0,05	2,93 ± 0,16	21,8 ± 0,4	36,0 ± 0,6
Simbiótico	5,42 ± 0,11	2,75 ± 0,05	2,66 ± 0,07	24,1 ± 1,0	34,8 ± 1,2
Teste F	NS	NS	NS	NS	NS
CV(%)	9,4	8,8	17,4	22,6	15,2

<sup>1</sup> Não houve interação significativa entre os fatores; <sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%); NS = não significativo; \* ( $P < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 4.** Médias e erro padrão da média das características do hemograma<sup>1</sup> de leitões em função do número de dias pós-desmame e das diferentes dietas.

Fatores <sup>2</sup>	He 10 <sup>3</sup> /μL	Le μL	Hb g/dL	Ht %	EOS %	NBast %	NSeg %	LINF %	MON %	Plaq μL
Dias										
0	5.933 ± 125 <sup>B(3)</sup>	8.935 ± 518 <sup>C</sup>	11,6 ± 0,2 <sup>B</sup>	38,8 ± 0,5 <sup>B</sup>	2,4 ± 0,3 <sup>A</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>A</sup>	36,5 ± 1,6 <sup>B</sup>	57,3 ± 1,5 <sup>B</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>A</sup>	339.833 ± 8.920 <sup>C</sup>
7	7.241 ± 79 <sup>A</sup>	9.980 ± 485 <sup>B</sup>	13,8 ± 0,1 <sup>A</sup>	45,5 ± 0,6 <sup>A</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>B</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>B</sup>	33,9 ± 1,9 <sup>C</sup>	63,3 ± 1,8 <sup>A</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>B</sup>	458.925 ± 22.901 <sup>B</sup>
14	7.192 ± 96 <sup>A</sup>	17.805 ± 914 <sup>A</sup>	13,4 ± 0,3 <sup>A</sup>	44,4 ± 1,2 <sup>A</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>B</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>B</sup>	55,5 ± 2,1 <sup>A</sup>	40,9 ± 2,2 <sup>C</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>B</sup>	571.200 ± 19.062 <sup>A</sup>
Teste F	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
Dietas										
Basal	7.165 ± 191	12.216 ± 1.046	13,4 ± 0,3	44,6 ± 1,2	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,2	40,4 ± 3,6	56,8 ± 3,7	1,3 ± 0,2	556.917 ± 26.725
Antibiótico	7.239 ± 122	11.266 ± 1.416	13,7 ± 0,3	45,3 ± 1,1	1,0 ± 0,3	0,7 ± 0,2	39,5 ± 4,5	57,3 ± 4,6	1,4 ± 0,2	532.334 ± 44.369
Probiótico	7.324 ± 92	13.166 ± 1.617	13,9 ± 0,2	43,9 ± 1,4	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	43,8 ± 4,7	53,0 ± 5,1	1,0 ± 0,4	473.834 ± 42.982
Prebiótico	7.164 ± 155	13.683 ± 1.828	14,0 ± 0,4	47,2 ± 1,8	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,2	39,1 ± 5,0	57,9 ± 4,7	1,4 ± 0,4	435.250 ± 36.604
Simbiótico	7.233 ± 125	12.608 ± 1.417	13,4 ± 0,2	44,7 ± 0,8	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,2	42,7 ± 4,4	54,2 ± 4,4	1,4 ± 0,2	483.417 ± 42.423
Teste F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CV(%)	7,6	26,5	8,0	9,6	92,2	84,5	26,6	18,2	73,2	23,8

<sup>1</sup> He = hemácias, Le = leucócitos, Hb = hemoglobina, Ht = hematócrito, EOS = eosinófilo, NBast = neutrófilo bastonete, NSeg = neutrófilo segmentado, LINF = linfócitos, MON = monócitos, Plaq = Plaquetas; <sup>2</sup> Não houve interação significativa entre os fatores; <sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%); NS = não significativo; \* ( $P < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ ).

Para as proteínas séricas totais e albumina foram observados valores que decresceram ( $p < 0,05$ ) do dia do desmame para os 7 dias pós-desmame, ocorrendo aumento ( $p < 0,05$ ) aos 14 dias pós-desmame em relação ao 7º dia independente da dieta consumida. Para as globulinas verificou-se que os menores valores ( $p < 0,05$ ) foram encontrados aos 7 dias e os

maiores aos 14 dias pós-desmame. A albumina é sintetizada pelo fígado, sendo catabolizada por todos os tecidos metabolicamente ativos (Kaneko, 1989) e quando a concentração dos aminoácidos nas células teciduais diminui a níveis inferiores àqueles do plasma, os aminoácidos, penetram nas células e são usados para síntese de proteínas essenciais dos

tecidos (Swenson, 1984). Desta forma, esta redução nos níveis de proteínas séricas totais após o desmame provavelmente se deve ao baixo consumo alimentar do leitão neste período, causando uma depleção em suas reservas protéicas, recuperando-se posteriormente quando o consumo de ração aumenta.

A fração alfa globulina não se alterou ( $p > 0,05$ ) com as diferentes idades. Porém, as frações beta+gama globulinas foram maiores ( $p < 0,05$ ) aos 7 dias quando comparadas com 14 dias pós-desmame.

Em relação aos dados do hemograma, foram verificados aumentos ( $p < 0,05$ ) nos valores após o desmame para hemácias, leucócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Essas modificações podem ser devidas à liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), causando aumento na pressão sanguínea e contração esplênica, a qual mobiliza hemácias, introduzindo-as na corrente circulatória. Além disso, a adrenalina, liberada em resposta à excitação ou estresse, mobiliza as células marginais para a circulação, o que concorre também para o aumento na contagem global dos leucócitos quando o animal é excitado (Swenson, 1984). Esses fatos podem explicar o aumento no número de células brancas e vermelhas dos leitões após o desmame, em função do estresse naturalmente presente neste período e da manipulação do animal no momento da coleta. Swenson (1984) afirmou que nos suínos recém-nascidos, o número de leucócitos por microlitro de sangue é aproximadamente a metade daqueles dos suínos adultos. Por volta de cinco a seis semanas de idade o número é semelhante ao encontrado nos adultos. Os resultados obtidos concordaram com Jiang *et al.* (2000), os quais verificaram aumento no número de leucócitos com o aumento da idade dos animais pós-desmame.

No caso dos eosinófilos, neutrófilos bastonetes e monócitos ocorreram decréscimos ( $p < 0,05$ ) nos valores observados aos 7 e 14 pós-desmame em relação ao dia do desmame. Para neutrófilos segmentados, os resultados demonstraram diminuição ( $p < 0,05$ ) aos 7 dias em relação ao dia do desmame, com recuperação ( $p < 0,05$ ) aos 14 dias pós-desmame. Quanto aos linfócitos, observou-se aumento ( $p < 0,05$ ) no dia 7 com relação ao dia do desmame e diminuição ( $p < 0,05$ ) aos 14 dias pós-desmame.

Segundo Feldman *et al.* (2000), a função primordial dos eosinófilos é combater substâncias tóxicas e portanto estarão presentes em maior quantidade nos locais onde ocorrem reações antígeno-anticorpo e nos pontos de penetração de substâncias estranhas ao organismo e, em menor quantidade, na corrente circulatória em situações de estresse, reaparecendo no período de recuperação. Desta forma, esta menor concentração de eosinófilos na corrente sanguínea no pós-desmame indicou maiores redistribuição e marginação das células eosinófilas causadas pelo estresse desta ocasião.

Tais alterações nos parâmetros sanguíneos se devem provavelmente ao estresse provocado pelo desmame, pela ausência materna, hierarquia social, mudança de dieta, redução no consumo de alimento e mudança de instalações (Hannas, 2003).

As variações ocorridas nos valores absolutos dos parâmetros sanguíneos, com o aumento da idade dos animais, estão de acordo com os dados da literatura (Feldman *et al.*, 2000).

## Conclusão

Os resultados demonstraram que a inclusão de antibiótico, probiótico e/ou prebiótico não interferiu nas atividades específicas das enzimas de mucosa, mas foram observados aumentos das atividades da sacarase e da maltase entre 7 e 14 dias pós-desmame na presença do prebiótico isoladamente, quando os fatores foram desdobrados. Os microingredientes testados não influenciaram os valores do hemograma, das proteínas séricas totais e das globulinas.

## Referências

- CHESSON, A. Probiotics and other intestinal mediators. In: COLE, D.J.A. *et al.* *Principles of Pig Science*. Nottingham: University Press, p.197-214, 1994.
- DAHLQVIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.7, n.1, p. 18-25, 1964.
- FELDMAN, B.F. *et al.* *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000.
- FRASER, C.M. *Manual Merck de Veterinária*. São Paulo: Roka, 1991.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bact.* v.66, p. 365-378, 1989.
- HANNAS, M.I. *Plasma suíno e ovo inteiro desidratado em substituição a proteína bruta do leite em pó nas rações de leitões*. 2003, Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003..
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.
- JIANG, R. *et al.* Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 130, p. 21-26, 2000.
- KANEKO, J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. California: Academic Press, 4. ed. 1989.
- KELLY, D. *et al.* Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *Br. J. Nutr.*, London, v. 65, p. 169-180, 1991.
- KIDDER, D.E.; MANNERS, M.J. The level and distribution of carbohydrases in the small intestine mucosa of pig from 3 weeks of age to maturity. *Br. J. Nutr.*, London, v.43, n.2, p.141-153, 1980.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba, SBZ, 2001, p.141-157.
- NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirement of Swine*. 10th Ed. Washington, National Academic Science, 1998.
- NICHOLSON, J.A.; KIM, Y.S. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.63, p.110-117, 1975.
- PERDIGON, G. *et al.* Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.70, p.919-926, 1986.
- PLUSKE, J.R. *et al.* Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.*, Amsterdam, v.51, p.215-236, 1997.
- POLLMANN, D.S. *et al.* Effect of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 51, supl. 1, p. 638, 1980.
- REPETTI, E. *et al.* *Valores normais do quadro hematológico dos animais domésticos*. UNIMAR, 2p., 2003. Disponível em: <http://www.unimar.br/ciencias/6-2-1.html>. Acesso em: 21 Ago. 2003.
- ROBERFROID, M.B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharide. *Nutr. Rev.*, Washington, DC., v.54, p.S38-S42, 1996.
- ROSTAGNO, H.S. *et al.* *Tabelas brasileiras para aves e suínos - Composição de alimentos e exigências nutricionais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- ROY, M.; GIBSON, G.R. Probiotics and prebiotics – microbial in menu. *C-H-O Carbohydrates*, v.9, n.3, 6p., 1998.
- SEVELIUS, E., ANDERSSON, M. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. *Vet. Record.*, v.137, p.663-667, 1995.
- SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes.. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v.33, n.4, p. 55-65, 2003.
- SOTO, W.L.C. *Digestibilidade da levedura desidratada e efeitos da sua utilização sobre a morfologia intestinal, atividade das enzimas digestivas e desempenho de suínos*. 1999, Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.
- SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Inc. *SAS user's guide: Statistics*. Cary: SAS Inst., Inc. 1998, 956p.
- SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes celulares e químicos do sangue – Capítulo 2. In: SWENSON, M.J. (Ed.). *Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos*. 10. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, p. 13-34, 1984.
- TUCCI, F.M. *Efeitos da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a renovação celular da mucosa intestinal, enzimas digestivas e desempenho*. 2003, Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- TUCCI, F.M. *et al.* Efeitos da adição de glutamina, ácidos graxos poliinsaturados ou parede celular de levedura na dieta de leitões desmamados sobre a atividade das enzimas digestivas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. *Anais...*Recife: SBZ, 2002, CD-ROM.
- WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.9, p. 668-675, 1998.
- XU, Z.R. *et al.* Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.*, Savoy, v. 82, n.6, p.1030-1036, 2003.

*Received on April 29, 2004.*

*Accepted on December 27, 2004.*