

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ENGENHARIA

CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA
ALIMENTAÇÃO INICIAL DE BEZERROS**

HUMBERTO CÁFARO FILHO

Ilha Solteira/SP
2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA – CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMA DE PRODUÇÃO ANIMAL

UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA
ALIMENTAÇÃO INICIAL DE BEZERROS

AUTOR: HUMBERTO CÁFARO FILHO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO BATISTA ALVES

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia/
Unesp/Campus de Ilha Solteira,
para a obtenção do título de Mestre
em Zootecnia- Área de
concentração: Sistema de
Produção Animal

ILHA SOLTEIRA/SP
Setembro de 2002

À minha esposa, Fátima Madalena Coutinho Lourenço
Cáfaro, pelo amor, carinho e cumplicidade em todos os momentos.

Aos meus filhos, Juliana Cáfaro, Beatriz Cáfaro e Humberto Cáfaro
Neto, realização maior da minha vida.

Aos meus pais, Humberto Cáfaro e Aparecida A. Scarlatte Cáfaro,
razão da minha existência.

DEDICO.

A G R A D E C I M E N T O S

À UNESP – Campus Ilha Solteira, pela grande contribuição na minha formação e na condução deste trabalho.

À UNICASTELO – Campus Fernandópolis, por ter cedido as instalações para condução deste trabalho.

À AGROPECUÁRIA CÁFARO, por ter patrocinado todos os custos deste trabalho.

Ao Professor Dr. João Batista Alves pelo exemplo de humildade e grande contribuição na condução do curso de Mestrado.

À Pró-Reitora Mileny Milesi e a Diretora Geral Denigrace Barbosa Lisboa, da UNICASTELO, pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À Professora Dra. Dora Inês Kozusny Andreani pelo apoio nos trabalhos de laboratório.

A Professora Dra. Adriana da Cruz França Lema pelo apoio nos trabalhos de campo.

Ao Professor Dr. Evaristo Bianchini pela contribuição e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Sr. Júlio César Silva da Saf do Brasil – Divisão Agropecuária, colaboradora do projeto.

Ao Sr. Lúcio Flávio de O. Gouvêa, Gerente de Marketing e vendas da CHR HANSEN, colaboradora do projeto.

Ao Sr. Andrew Jones, gerente da Fazenda São Pedro, do Grupo CFM – Agropecuária, que proporcionou suporte à experimentação com os animais.

Ao meu irmão José Afonso Cáfaros, que administrou a empresa da família permitindo minha dedicação integral ao trabalho.

Ao Médico Veterinário José Paulo Franco do Santos Gomes, pelo apoio nos trabalhos de campo.

Aos estagiários Anderson, Silvia Rodrigues dos Santos, Carla Cristina Genova Sanita e Ana Karina Diniz Junqueira Custódio (in memória), pelo auxílio no manejo dos animais e coleta de dados.

Aos bibliotecários João/UNESP e Lúcia/UNICASTELO, pelo auxílio na adequação às normas exigidas pela Instituição.

HOMENAGEM

Ao Professor João Batista Alves, pela valiosa contribuição acadêmica e científica, pela amizade e pelo importante papel em minha formação profissional.

SUMÁRIO

página

AGRADECIMENTOS	III
HOMENAGEM	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1. Probióticos	02
2.2. Probiótico na alimentação animal	07
3. MATERIAL E MÉTODOS	09
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIA	19
7. APÊNDICE: A	22

LISTA DE TABELAS

Página

1. Valores médios, máximos e coeficientes de variação para as variáveis analisadas.....13
2. Ganho de peso vivo total em Kg (GPVT), consumo de concentrado na última semana em Kg (CCUS), ocorrência de diarreia (ODA) e dias com diarreia (DCD)13

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Porcentagem de animais tratados com antibióticos (PTA), óbitos por diarreia (OD)
.....16

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito do fornecimento de probióticos comerciais e *Lactobacillus acidophillus* isolado *in vitro* de fezes, sobre o desempenho de bezerros provenientes de rebanhos leiteiros da região de Fernandópolis-SP, desde o nascimento até 42 dias de idade. Vinte e quatro bezerros machos, recém-nascidos, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizados, com os seguintes tratamentos: T1- testemunha; T2- probiótico comercial¹®; T3- probiótico comercial²®; T4- concentrado de células vivas de *Lactobacillus acidophillus*. Os probióticos foram fornecidos. Os animais foram inicialmente alimentados com 4 litros de leite por dia e a partir da segunda semana de idade, com concentrado e feno de grama estrela *Cynodon dactylon*, os quais foram fornecidos à vontade. Não houve diferenças entre tratamentos no consumo de concentrado, no ganho de peso, na incidência de diarreia e no período em que os animais estiveram com diarreia. Os tratamentos que receberam probiótico comercial e concentrado de células vivas de *Lactobacillus acidophillus* tiveram uma menor incidência de óbitos, assim como animais em estado crítico de saúde, que o grupo testemunha.

Palavras Chave: Probióticos, bactérias lácticas, bezerros, diarreia.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the effect of commercial probiotic supplies and *Lactobacillus acidophilus* isolated *in vitro* of feces about the performance of calves from dairy cattle of the region of Fernandópolis, SP, since their birth up to they were 42 days of age. Twenty-four newborn male calves were distributed in delineation totally at random according to the following treatments (T): T1 – the control; T2 – commercial probiotic^{1®}; T3 – probiotic commercial^{2®}, T4-*Lactobacillus acidophilus* viable-cell concentration. The probiotics were supplied. Firstly the animals were fed with 4 (four) litters of milk a day. After they were two-weeks old they were given concentration and star grass hay *Cynodon dactylon* - both supplied freely. There were no differences among the treatments in the consumption of the concentration above, in the weight gain, in the incidence of diarrhea as well as the days they had diarrhea. The treatments, which were fed with commercial probiotic and the *Lactobacillus acidophilus* viable-cell concentration, had a minor incidence of the death tolls as well as unhealthy animals than the control.

Key words: probiotic, lactic bacteria, calves, diarrhea.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da aversão pública quanto ao uso de antibióticos e seus problemas potenciais causados em alguns casos pela sua utilização de forma desmedida trouxe como consequência o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes, dificultando, desta forma, o controle de certos microrganismos patogênicos. Além deste fato existem outros, não menos importantes, tais como toxicidade, alergias etc, que devem ser considerados quando da utilização de antibióticos para tratamentos de doenças.

O interesse comercial pelos probióticos só foi despertado há poucos anos, Os probióticos são bactérias que agem como um suplemento alimentar, capazes de afetar benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da sua microflora intestinal. Outra importante função dos probióticos é impedir a fixação de microorganismos patogênicos, ocupando sítios de ligação nos eritrócitos e produzindo substâncias antibacterianas como (bacteriocinas, ácido lático, diacetil e peróxido de hidrogênio produto do seu metabolismo).

Os probióticos, na alimentação animal, propõem-se a substituir os antibióticos com a mesma eficiência e mais as vantagens de um “alimento saúde”, há algum tempo vêm surgindo no mercado várias formas deste produto, o que torna muito importante o seu estudo, para que possamos comparar e comprovar a sua eficiência. Considerando as poucas informações sobre os efeitos do probiótico em bovinos, o presente trabalho teve por objetivo verificar a ação de probióticos comerciais e probióticos isolados em laboratório de pesquisa, sobre o controle de diarréias, ganho de peso e consumo de concentrado em bezerros leiteiros durante o período de aleitamento, em condições específicas para a região de Fernandópolis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROBIÓTICOS

Os probióticos originaram-se há centenas de anos, mas somente no início do século passado foram estudados racionalmente e pesquisados com bases científicas. As primeiras pesquisas sobre atividades probióticas de cunho científico foram desenvolvidas pelo bacteriologista russo, Ilya Metchnikoff em 1908. Descobriu que, determinadas dietas baseadas em leite fermentado à base de bactérias produtoras de ácido lático, poderia proporcionar efeitos benéficos, o que mais tarde passou a ser chamado de *Bacillus bulgaricus*, um dos microrganismos básicos para a elaboração do iogurte de hoje. Com isto, substâncias tóxicas responsáveis pelo envelhecimento, não eram formadas, assim nascia o conceito de microrganismo inoculado baseado no princípio da exclusão competitiva. O Conceito da exclusão competitiva, apesar de aceito, só foi provado muito mais tarde, em um trabalho desenvolvido por Nurmi & Rantala, em 1973, quando observaram que o conteúdo intestinal das aves adultas normais, quando administrado oralmente às aves com um dia de vida, alterava a sua sensibilidade à infecção com *Salmonella sp*, prevenindo o estabelecimento desta no intestino. Esta idéia foi conceituada como "Exclusão Competitiva" e tornou-se conhecida como o "Conceito de Nurmi". Em 1933 na Universidade de Cornell, pesquisadores descobriram que todos os animais de sangue quente tinham em seu intestino delgado os mesmos microrganismos produtores de ácido lático. Na década de 40 as pesquisas com probiótico praticamente cessaram, pois com a descoberta da penicilina, seguida do seu imediato uso na alimentação animal, conseguiram-se resultados incríveis no aumento de produção e na diminuição dos problemas de saúde animal. Com o uso sem critério e contínuo do antibiótico, observou-se que estes destruíam as bactérias benéficas, assim como induziam ao aparecimento de bactérias resistentes. Outras consequências relacionadas ao emprego indiscriminado e abusivo de antibióticos são a: queda na eficiência dos antibióticos devido à resistência das bactérias aos mesmos; a presença de resíduos não degradáveis de antibióticos nos alimentos de origem animal que podem contribuir para um aumento destes problemas (BERTECHINI, 1997). As consequências negativas apresentadas pelo uso de antibióticos trouxeram a tona os efeitos benéficos de certas bactérias, chamadas comumente de probióticos.

Probióticos são produtos que carregam de forma viável microrganismos de origem intestinal e de espécie animal específica, com a finalidade básica de restaurar ou manter o equilíbrio microbiano intestinal.

Segundo MARTIN e NISBET, 2000, no ano de 1999, o FDA (Food and Drug Administration), considerou que o termo probiótico era inconsistente para a finalidade a que se propunha e adotou o termo DFM (Direct Fed Microbials) passando a exigir dos fabricantes a substituição nas embalagens. O FDA define DFM como "uma fonte de microrganismos vivos encontrados na natureza", incluindo bactérias e fungos.

Ao nascer, os animais recebem do organismo materno uma inoculação de microrganismos benéficos que, alojados no intestino, vão dar-lhe maior resistência contra os germes presentes no ambiente. Nos mamíferos, a inoculação se dá no momento do parto (há grande quantidade de Bacilos de Doderlein no muco vaginal) e via amamentação. Os animais, ao entrarem em contacto com o ambiente, também se contaminam por incontáveis bactérias que vão por em risco a sua saúde, caso encontrem condições favoráveis a sua acelerada multiplicação, como a ausência ou presença em baixo número das bactérias lácticas. O *Lactobacillus acidophilus*, principal espécie dos Bacilos de Doderlein, é o primeiro a colonizar o trato digestório, presente no muco vaginal das fêmeas de todos os mamíferos. Eles fazem a primeira acidificação do estômago e intestino, uma vez que não há secreção de ácido clorídrico nas primeiras horas de vida, podendo ocorrer a penetração e colonização do trato por microrganismos patogênicos. Com a colonização do trato intestinal e a acidificação do estômago, há uma maior proteção contra a penetração de patógenos sensíveis ao meio ácido (BERTECHINI, 1997).

Segundo PIARD et al., (2000) são três os tipos de atividades probióticas; a primeira está relacionada à digestibilidade da lactose, presente em abundância nos produtos lácticos. Este carboidrato pode induzir a intolerância nos consumidores que possuem deficiência congênita em lactase, a enzima que o degrada. Curiosamente esses sintomas aparecem quando a lactose é absorvida do leite, mas são ausentes quando absorvidas do iogurte nas mesmas proporções. O que pode ser explicado pelo fato de que as bactérias do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) suplementam a deficiência de lactase do hospedeiro com a sua própria; através do estímulo na mucosa intestinal do hospedeiro e a produção endógena da lactase. A segunda atividade probiótica exercida pelas bactérias lácticas (BL) é higienizar o tubo digestivo que hospeda uma flora microbiana abundante, já que parte delas pertencem ao grupo das bactérias lácticas. Essa flora exerce uma função importante no hospedeiro impedindo o aparecimento de infecções digestivas causadas pelas bactérias

patogênicas. A terceira atividade da flora endógena do hospedeiro é estimular as respostas imunitárias, possuindo uma função de barreira protetora, já que certas BL mostraram-se capazes de diminuir os sinais clínicos ligados às funções intestinais. Algumas linhagens de BL possuem atividades adjuvantes que estimulam a resposta imunitária do hospedeiro contra antígenos. Dentre as bactérias do gênero *Lactobacillus*, a espécie *L.casei* estimula a resposta imunitária das crianças quando vacinadas por via oral contra rotavírus, vírus responsável pela diarreia aguda infantil e o *Lactobacillus acidophilus* quando administrado em bezerros controla a diarreia dos mesmos.

PIARD et al., (2000), atribuiu outras atividades aos probióticos, sendo as mais interessantes os efeitos antiolesterolêmicos e antitumorais.

De acordo com FERNANDES et al., (2000), as hipóteses dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos são: competição pelos sítios de adesão; atividade antimicrobiana, neutralização de enterotoxinas; alteração no metabolismo; aumento de imunidade.

O mecanismo de ação das bactérias probióticas não está completamente elucidado, sabe-se que há um sinergismo entre elas. Quatro grandes processos são descritos: a) competição por sítios de ligações; b) competição por nutrientes; c) estímulo do sistema imunológico; d) produção de substâncias antibacterianas e enzimas, entre elas, as bacteriocinas ou antibióticos no intestino, NEPUMUCENO et al., (2000).

Geralmente se utiliza os probióticos na forma de esporos, que germinam no aparelho digestório, ou microencapsulados (os não esporulados), os quais têm pouca probabilidade de se multiplicarem no intestino por isso, deve-se ministrar de forma contínua, PIARD et al., (2000).

A microbiota influi direta ou indiretamente no estado de saúde do ser humano e de animais, através dos seguintes mecanismos: produção de vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta; degradação de substâncias alimentícias não digeridas; integridade do epitélio intestinal, estímulo da resposta imunitária e proteção frente a microorganismos enteropatógenos. A estabilidade da microbiota intestinal é indispensável para o desenvolvimento destas funções, considerando que o trato digestório é um sistema fechado, (RUEDA et al., 2000).

Durante anos, tem-se recomendado, para utilização de aditivos, o uso de microrganismos com características de adesão às células epiteliais do intestino e de multiplicação rápida. Entretanto, cepas de outras bactérias, como *Bacillus cereus*, apesar de não aderirem ao epitélio intestinal, têm se mostrados plenamente eficazes como bio-reguladores. A ação dos microrganismos não depende de sua capacidade de colonização, porem sim da capacidade de aderência que utilizam como bio-reguladores, demonstrando que

a administração dos mesmos nos animais varia de um microrganismo para outro. Aqueles que se aderem as células epiteliais podem ser administrados a intervalos de 3 a 4 dias e os que não se aderem devem ser administrados de forma contínua, como ocorre, por exemplo, com as leveduras, (RUEDA et al., 2000).

As bactérias lácticas são as mais estudadas e representam o principal grupo utilizado na produção de bacteriocinas. Os principais gêneros das BL são: *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*. Algumas características das BL são: Gram positivas, não esporuladas, catálise negativa, desprovidas de citocromos, anaeróbias facultativas, fastidiosas (exigem meio de cultura altamente específico), ácido tolerantes, apresentam metabolismo fermentativo sendo o ácido láctico o principal produto de fermentação, crescem em diferentes temperaturas e em altas concentrações de NaCl, toleram pH ácido e alcalino. Além da produção de bacteriocinas, as BL exercem sua atividade antagonista contra bactérias patogênicas através da produção de ácido láctico, diacetil e peróxido de hidrogênio. Não só as BL apresentam a capacidade de produzir as bacteriocinas, mas muitos outros gêneros também, NEPUMUCENO et al., (2000).

O trato gastrointestinal do homem e dos animais apresenta uma superfície extensa de contato direto entre hospedeiro e as substâncias ingeridas, incluindo os microrganismos patogênicos e toxinas. Ao mesmo tempo em que o intestino tem a função de absorver nutrientes, deve também impedir a penetração de agentes patogênicos. Essa função só será maximizada, quando o trato intestinal apresentar o mecanismo de defesa da mucosa, imunológico e não imunológico, funcionando perfeitamente. A microbiota estabelecida após o nascimento permanece relativamente constante, a não ser que mudanças nas funções fisiológicas do hospedeiro e no ambiente ou na dieta modifiquem o ambiente intraluminal do trato digestório. A regulação da microbiota intestinal é exercida por uma série de funções que são necessárias para manter cada espécie bacteriana em seus locais de colonização e em níveis normais de crescimento, premiando assim de possíveis efeitos patológicos, tais como crescimento anormal da microbiota residente, colonização por microrganismos de sítios atípicos da mucosa e fixação de microrganismos transientes e/ou patogênicos. Nesses casos os probióticos aparecem como potenciais agentes para auxiliar nos tratamentos. Para que os microrganismos atinjam o nível de probiótico, devem possuir estabilidade em condições normais por um período não inferior a 30 dias, capacidade das estirpes para colonizar o trato digestivo, influenciar de modo favorável a microbiota intestinal e o estado de saúde dos animais com um melhor índice de produção, (FERNANDES et al., 2000).

Vários são os aspectos a serem considerados para seleção e produção de microrganismos para utilização como probiótico: serem habitantes normais do trato gastrointestinal de animais saudáveis e específicos; serem capazes de produzir culturas com células vivas em concentrações efetivas de 10^6 e 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mol para *Lactobacillus* e bactérias bífido, respectivamente. Os microrganismos devem ser cultivados em meio ambiente muito semelhante ao que vão ser introduzidos, do contrário o seu tempo de crescimento vai ser prolongado e eles não vão conseguir se multiplicar e colonizar o intestino; possuir bactérias capazes de serem ativadas e multiplicadas rapidamente, após a ingestão do produto, com o intuito de inibir patógenos e propiciar condições de resistência ao peristaltismo; as estirpes selecionadas devem ser Gram-positivas e tolerantes a enzimas salivares, ácidos estomacais, sais biliares no intestino delgado e ácidos orgânicos no intestino grosso; serem capazes de aderir às células epiteliais do intestino e excretar fator anti-*Escherichia coli*; não podem ser patogênicos ou capazes de produzir efeitos adversos ao hospedeiro; serem estáveis e manterem a viabilidade por longos períodos quando estocados; resistirem à antibióticos e às altas temperaturas de processamento; serem capazes de produzir culturas vivas e de eficiência comprovada no animal em questão. A mistura de diferentes microrganismos é mais segura do que uma única espécie ou estirpe no produto comercial, (FERNANDES et al., 2000).

2.2. PROBIÓTICO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Nos últimos anos, as pesquisas e a utilização dos probióticos têm avançado motivadas principalmente por exigência de um mercado mais seletivo quanto à qualidade dos produtos, exigindo cada vez mais alimentos naturais sem aditivos químicos.

O consumidor europeu, ainda assustado com escândalos envolvendo alimentos obrigou a União Européia a tomar uma medida drástica proibindo o uso de antibióticos e promotores de crescimento na alimentação animal, Embora em alguns países eles já estivessem proibidos há vários anos, ALMEIDA et al., (2000),.

Para a realidade brasileira, que objetiva a exportação, esta medida afetou profundamente os produtores, que para manterem-se no mercado e conquistar a Comunidade Européia, deverão buscar uma alternativa que substitua de imediato os promotores de crescimento e antibióticos.

Muitas empresas, antecipando-se às necessidades de mercado, têm lançado probióticos comerciais, entretanto deve-se lembrar que, em se tratando de organismos vivos a sua ação está sujeita a uma série de variáveis como a viabilidade do cultivo microbiano que depende de condições de armazenamento, de diferenças devidas às variedades de bactérias utilizadas, das doses e frequência de alimentação, de problemas específicos de cada espécie e interação com drogas presentes na dieta.

MUÑOS et al.(1994) avaliando o uso de um probiótico comercial a base de lactobacilos sobre o comportamento produtivo de leitões durante as fases de recria e engorda,verificaram que não houve diferença entre os lotes. Por outro lado FERREIRA et al. (1995), utilizando outro probiótico comercial (Paciflor) na alimentação de coelhos dos 30 dias até se atingir o peso de 2 kg, observaram que não houve alteração do período de crescimento e do ganho de peso médio diário, mas houve redução do consumo médio diário e melhora na conversão alimentar.

GONÇALVES et al. (2002), trabalhando com diferentes cepas de probióticos desenvolvidos em laboratório, e antibiótico na alimentação de frango de corte, não verificaram efeito do probiótico sobre o desempenho das aves, enquanto que CAVALCANTI et al. (2002), estudando os efeitos de probiótico no desempenho de frangos de corte, consumindo dietas com farinhas de carne e ossos com diferentes níveis de contaminação bacteriana, verificaram que o probióticos reduziram pela metade a incidência de diarreias na primeira semana de idade das aves.

CORREIA et al. (2002), trabalhando com probióticos em frango de corte, a partir de um dia de vida, verificaram que um dos probióticos utilizados propiciou aumento no peso vivo, carcaça e peso e rendimento de cocha.

QUINTERO et al., (2002) avaliaram a eficiência de 2 probióticos comerciais na alimentação de leitões durante o crescimento e terminação; os probióticos não melhoraram os rendimentos dos cortes principais da carne.

MOLETTA E PEROTTO (1998) avaliaram o uso de probióticos em bezerros de corte desmamados aos 73 dias de idade, fornecendo probiótico comercial via oral em uma única aplicação, no dia do desmame na dosagem de 15g/animal. Os resultados demonstraram menor incidência de diarreia (53,66%) nos animais tratados com probióticos, em relação ao grupo sem probiótico (73,66%), em relação a incidência de diarreia. Também, foi constatado diminuição no número de dias com diarreia, sendo em média de 3,2 dias nos animais que usaram probiótico e de 4,2 dias no grupo testemunha.

CHAVES et al. (1999) verificaram que o fornecimento junto ao leite, da estirpe de *Lactobacillus acidophilus* LT 516, a partir do nascimento até os 56 dias de idade ou do nascimento até 10 dias de idade, não influenciou significativamente os consumos de matéria seca, de proteína bruta e no ganho de peso, mas observaram a diminuição na ocorrência de diarreia.

ZANETTI et al. (1999), compararam o desempenho de bezerros recém nascidos e submetidos a dietas contendo antibiótico, probiótico Acid-Mos (Lactobacilos, enzimas e manose,) e uma testemunha sem aditivos. Verificaram que os bezerros que receberam leite com antibiótico ou com probiótico obtiveram ganho de peso semelhantes, mas superior à testemunha, e a conversão alimentar foi melhor no tratamento com probiótico. A incidência média de diarreia, nos 60 dias de experimento, foi de apenas 1,75, 1,50 e 2,08 dias, para os animais tratados com probiótico, antibiótico e o testemunha, respectivamente.

AVILA et al. (1995) estudaram a eficiência da associação do probiótico e vacina no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. Os resultados mostraram que a associação de vacina com probiótico administrado por 15 e 30 dias foram os tratamentos mais eficientes no controle da diarreia e no ganho de peso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no CAMPUS – VII da Universidade Camilo Castelo Branco, localizada no município de Fernandópolis, Estado de São Paulo. Os animais utilizados foram 24 bezerros machos, mestiço holandês, com um dia de vida, os quais após a ingestão do colostro eram retirados da mãe e levados para a área do experimento. Para tal fim utilizaram-se 24 gaiolas individuais de madeira com cobertura em telha cerâmica, para proteção contra o sol e a chuva, e com boa ventilação, com dimensão de 1,0 por 1,50 m, com fundo ripado e distantes a 0,30 m do solo aproximadamente. As gaiolas foram equipadas com acessórios para fornecimento de água, leite, feno e cocho para ração concentrada. Para receber os bezerros, as gaiolas foram polvilhadas com cal, deixando o piso completamente branco, esta operação de desinfecção foi repetida todas as semanas. Para tal fim, todos os animais eram retirados das gaiolas e transferidos para um piquete comum, enquanto as gaiolas eram lavadas e desinfetadas.

Os bezerros, no início do experimento, foram avaliados quanto ao estado de saúde, e identificados através de brincos numerados, pesados após jejum de 12 horas.

Após a pesagem inicial cada animal recebeu 1 cc de medicamento à base de vitaminas ADE e 1 cc de vermífugo à base de ivermectina.

O manejo adotado para os bezerros foi adaptado do programa para desmama de bezerras leiteiras proposto pela Purina "Programa Purina Para Gado Leiteiro", utilizou uma ração concentrada a base de Farelo de soja e farelo de milho, produzida no local do experimento, a qual não continha antibiótico ou outro aditivo.

A alimentação utilizada durante a fase experimental foi de leite integral diluído com água na proporção de 4:1, 4 partes de leite em uma de água, conservado em câmara fria. Antes do fornecimento do leite para os animais o mesmo era aquecido até atingir uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O leite foi fornecido em baldes. Na primeira semana os bezerros receberam quatro litros de leite, metade pela manhã e metade à tarde; na segunda semana, três litros, sendo dois pela manhã e um à tarde, na terceira semana apenas dois litros, um pela manhã e um à tarde; na quarta e quinta semanas apenas um litro pela manhã. A partir do início da sexta semana não receberam mais leite.

O volumoso oferecido foi feno de Grama Bermuda (*Cynodon dactylon*), à disposição dos animais a partir da primeira semana. A análise bromatológica do feno apresentou a seguinte constituição em percentagem: Matéria Seca - 90,62; Proteína Bruta - 14,41; Fibra Bruta - 30,83; Extrato Etéreo - 2,36; Matéria Mineral - 6,28; Extrato Não Nitrogenado - 46,12 e Nutrientes Digestíveis Totais - 58,33%.

O concentrado começou a ser oferecido em pequenas quantidades (500 g) a partir da segunda semana no cocho e no balde (100 g), a cada período de mamada e permanecendo à disposição dos animais no cocho. Para os animais que estavam se adaptando, o concentrado era misturado ao leite devido a sua densidade, permanecia no fundo; após a ingestão do leite, o balde permanecia nas baias com a ração ainda úmida pelo leite, no fundo por aproximadamente meia hora. Periodicamente, o concentrado que estava disponível no cocho era trocado para evitar a fermentação. Na última semana, quando os animais estavam com 5 semanas de vida, o consumo de concentrado foi avaliado diariamente.

As estirpes de *Lactobacillus acidophilus* foram isoladas a partir de fezes de bezerros recém nascidos. A colheita das fezes em bezerros recém nascidos foi realizada segundo a metodologia descrita por (CHAVES et. al. 1999). Após massagem retal, a evacuação foi colhida em recipientes esterilizados, mantidos em caixas de isopor com gelo e água, conduzidas ao laboratório pesadas e utilizadas para realizar diluições seriadas (10^8) em solução tampão fosfato (pH 7,2).

As amostras devidamente diluídas foram distribuídas, pelo método "pour plate" (10^{-5} a 10^{-8}) em meio de cultivo seletivo para lactobacilos e incubadas a 37° C por 48 horas. Após a contagem total, com auxílio de um contador de colônias com características de *Lactobacilos*, as placas contendo colônias bem definidas foram selecionadas para realização do isolamento. Procurou-se selecionar as colônias tipo X ou rugosa, pois as estirpes que apresentam estas características são de comprovado valor terapêutico. Após 48 horas de incubação a 37° C, as culturas com crescimento evidenciado foram semeadas por estrias no agar Rogosa SL e incubadas, novamente, para posterior isolamento. Nesta etapa as colônias foram também transferidas para tubos contendo leite desnatado reconstituído (LDR), para verificação do tempo e a intensidade com que as culturas coagularam o meio, para a seleção da bactéria que ia ser utilizada no experimento.

Para avaliar as conseqüências da diarreia causada por distúrbios bacteriológicos, os bezerros acometido por diarreia continuavam sua dieta de leite normalmente.

Aos animais acometidos pela diarreia não lhes era negada ou alterado a dieta. Acompanhava-se o quadro clínico até um ponto considerado crítico, com inapetência, desidratação, diarreia sanguinolenta e prostração. A partir de então, o animal era reidratado com soro glicosado intravenoso e submetido a tratamento terapêutico à base de antibiótico, determinado pelo resultado da análise do antibiograma das fezes. Ao término do período de avaliação (42 dias), novamente foram pesados após um jejum de 12 horas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Com 16 graus de liberdade, cinco repetições, sendo que os animais não entraram no experimento ao mesmo tempo, mas foram distribuídos ao longo do período de nascimento. A duração do experimento foi de 42 dias até o desmame precoce. Os tratamentos utilizados foram: T1- sem probiótico; T2- probiótico comercial 1[®]; T3 – probiótico comercial 2[®]; T4 – *Lactobacillus acidophilus* vivos. Os animais não entraram no experimento ao mesmo tempo, mas foram distribuídos por sorteio ao longo do período de nascimento e substituídos em caso de morte nos respectivos tratamentos. O primeiro grupo entrou em 15/03/01, o segundo em 19/03/01 o terceiro em 26/03/01 e o quarto em 09/04/01. As análises foram efetuadas através do sistema SAS (System of Analyze Statistic).

Após o tratamento com *Lactobacillus*, os parâmetros analisados foram: frequência de diarreia, tempo de duração da diarreia, ganho de peso dos bezerros, ingestão de concentrado

1[®] Biosaf, nome comercial para *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de células vivas

2[®] Biobac, nome comercial para um poliprobótico contendo cepas selecionadas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium* na forma liofilizada

na última semana, número de animais submetidos à terapia com antibiótico, porcentagem de animais que sobreviveram à diarreia .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios, mínimos e máximos e os coeficientes de variação para o ganho de peso, consumo de concentrado, ocorrência de diarreia e total de dias com diarreia são mostrados na Tabela 1 e no Apêndice A. Os tratamentos não influenciaram ($P>0,05$) o ganho de peso vivo, o consumo de concentrado na última semana, a ocorrência de diarreia e o total de dias com diarreia (Tabela 2). Ao analisarmos a Tabela 1, verificamos grande variação entre os dados obtidos e alto coeficiente de variação, provavelmente devido ao fato de que o experimento foi conduzido de maneira que os bezerros chegaram em lotes diferentes e não todos ao mesmo tempo. Quando um animal foi acometido por diarreia este pode ter afetado outros dependendo do microorganismo ou agente ecológico.

Tabela1: Valores médios, mínimos, máximos e os coeficientes de variação para as variáveis analisadas.

Variável	Numero Animais	Mínimo	Máximo	Media Geral	CV
Ganho de Peso	20	-2,00	15,50	7,63	57,85
Ocorrência de Diarreia	20	1,00	6,00	3,20	41,92
Dias com Diarreia	20	4,00	26,50	11,40	47,87
Ingestão de concentr./última semana	20	3,15	7,74	6,29	25,61

Tabela 2: Ganho de peso vivo total em Kg (GPVT), consumo de concentrado na última semana em Kg (CCUS), ocorrência de diarreia (ODA) e dias com diarreia (DCD)

Tratamentos	GPVT (Kg)	CCUS(Kg)	ODA	DCD
T1	9,50 ^a	6,290 ^a	3,0 ^a	12,70 ^a
T2	6,25 ^a	4,222 ^a	3,0 ^a	10,40 ^a
T3	6,40 ^a	4,540 ^a	3,0 ^a	11,30 ^a
T4	8,20 ^a	5,293 ^a	3,8 ^a	11,20 ^a

O ganho de peso vivo no período de 42 dias não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos, porém observou-se que a variação deste parâmetro foi de 9,4 a 6,4 Kg, respectivamente para os tratamentos 1 e 3. Estes resultados demonstraram que os probióticos utilizados na alimentação dos bezerros não alteraram o ganho de peso no período experimental, geralmente, a utilização de probióticos não fornecem ganho de peso aos animais.

MOLETTA & PEROTTO, (1998), CHAVES et al. (1999) não constataram efeito positivo do probiótico sobre ganho de peso durante o período de fornecimento, nem no período posterior ao após o fornecimento do probiótico. ZANETTI et al. (1999), também não encontraram efeito do probiótico sobre o ganho de peso, mas observaram melhorias na conversão alimentar.

O baixo ganho de peso obtidos neste experimento, foi provavelmente consequência do estado sanitário dos animais durante a fase experimental, onde a diarreia foi um dos fatores responsáveis pelo baixo desempenho dos animais.

O consumo de concentrado ingerido na ultima semana de experimento não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Entretanto ao comparar o consumo com o ganho de peso, podemos observar que os animais dos tratamentos T1 e T4 foram os que mais ganharam peso provavelmente pela maior ingestão de concentrado. Além do concentrado os animais tinham a disposição feno de boa qualidade, mas o consumo não foi quantificado. O consumo de concentrado diário na quinta semana variou de 0,6 a 0,8 kg por dia, respectivamente para os tratamentos T2 e T1, o que mostrou que os animais apresentavam condições de serem desmamados.

A ocorrência de diarreia por animal, assim como o numero de dias com diarreia não diferiu estatisticamente entre tratamentos. O numero de ocorrência de diarreias variou de 3,8, (tratamento T4) a 3,0 (tratamentos T1, T2 e T3). Enquanto que o numero de dias com diarreia variou de 12,7 dias para o tratamento T1 a 10,4 dias para o tratamento T2. Foi observado que as diarreias ocorreram em todas as idades, vindo a diminuir somente na última semana. Todos os animais foram acometidos por diarreia (100%) e somente 2 animais pertencentes ao tratamento T2, foram afetados apenas em uma oportunidade, entretanto no mesmo tratamento houve um animal com seis reincidências de diarreia. Este animal identificado pelo numero 18 fazia parte do terceiro lote a entrar no experimento, sendo que houveram quatros lotes e as datas de entrada foram sucedidas na seguinte ordem, 15 de março, 19 de março, 26 de março e 9 de abril, do ano de 2001.

Geralmente o uso de probióticos leva a uma diminuição na incidência de animais que manifestam diarreia, aos animais não tratados, uma diminuição no numero de dias com

diarréia para aqueles animais que manifestam a doença, (MOLETTA e PEROTTO, 1998). ZANETTI et al. (1999), nos 60 dias de experimento, encontraram uma incidência média por bezerro de apenas 1,75 e 2,08 dias, para os animais tratados com ACID-MOS e o testemunha, respectivamente, sendo que essas diferenças não foram significativas. CHAVES et.al. (1999) relata que o fornecimento da estirpe LT 516 de *Lactobacillus acidophilus* como probiótico reduziu a ocorrência de diarréia, sem influir no odor e na consistência das fezes, já AVILA et al.(1995) concluíram que o fornecimento de um probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* por 15 e 30 dias, combinado com uma vacina contendo pili K99 e A14 de *Escherichia coli*, foi eficiente no controle da diarréia de bezerros.

CHAVES et al. (1999) sugerem que o modo de administração e a qualidade do produto além das condições do ambiente onde os ensaios são realizados, sem dúvida, podem justificar a diversidade dos resultados obtidos com a utilização de probióticos para bezerros.

O resultado deste experimento mostram maior incidência de diarréia que os dos trabalhos citados, o que pode sugerir que apesar das nossas instalações apresentar boas condições de higiene, outros fatores de meio pode ter contribuído para o aumento da incidência de diarréia, sendo que um destes fatores pode ter sido a prática da não retirada do leite da alimentação dos animais com diarréia, e do não tratamento destes animais acometidos pela diarréia a não nos casos extremos.

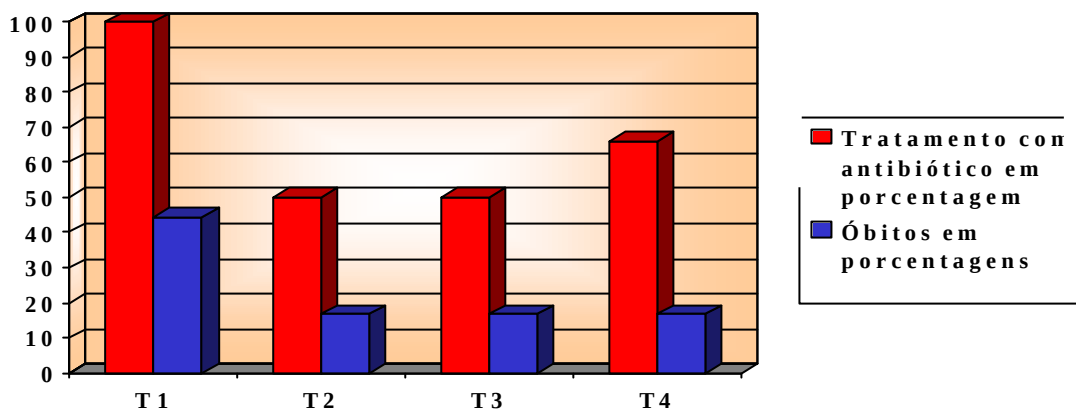
Segundo BERTECHINI (1997). Deve-se levar em conta que probiótico assim como antibiótico, é um nome genérico. Há probióticos com diferentes composições de microorganismos e mesmo os que possuem as mesmas espécies as cepas são diferentes. Por exemplo, não são todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* que são probióticos. As cepas devem ser rigorosamente selecionadas para que possam constituir um produto de grande eficácia.

A porcentagem dos animais acometida com diarréias necessitou de tratamento com antibióticos e as porcentagens de óbitos, são mostradas na Figura 1. A necessidade de tratamento com antibiótico apresentou diferenças consideráveis entre o testemunha e os demais tratamentos (T1- 111,1; T2- 50,0; T3-50,0; T4- 66,0 %). Todos os animais do grupo testemunha atingiram o estado crítico causado pela diarréia e tiveram de ser submetidos ao tratamento de rehidratação intravenoso e antibiótico. No T1 o total de procedimentos com antibiótico e soro intravenoso foram 10 (dez) sendo que um dos animais chegou ao estado crítico duas vezes, no T4 foram 4 (quatro) vezes e nos tratamentos T2 e T3 apenas 1 vez.

Mesmo com o uso de antibióticos injetáveis e procedimentos médicos convencionais, na tentativa de salvar os animais debilitados, a porcentagem de mortes causadas por diarréia

cujo agente etiológico foi a bactéria (*Echerichia coli*), foi muito maior no grupo testemunha que nos lotes que receberam os probióticos (T1- 44,44; T2- 16,66; T3- 16,66 e T4- 16,66%).

Figura 1: Porcentagem de animais tratados com antibiótico (PTA), óbitos por diarreia (OD)



T1= Testemunha

T2= Probiótico (poliprobótico)

T3= Probiótico (levedura)

T4= Probiótico (produzido em Laboratório)

modificados. Deve-se privilegiar as vias de autoclonagem, que evitam a introdução de DNA de outros organismos. Dentro deste panorama, deve-se distinguir os produtos destinados a alimentação, nos quais deve-se procurar "risco zero" para os consumidores, e os produtos oriundos de bactérias vacinas, para os quais os riscos de disseminação horizontais devem ser inferior aos riscos de uma população exposta a certo patógeno de sofrer com a doença. Neste último caso, o desenvolvimento de sistemas de confinamento que impeçam a sobrevivência das bactérias no ambiente devem ser procurados, (PIARD, 2000).

6. CONCLUSÃO

Nas condições em que se realizou o experimento o uso de probiótico não promoveu diferenças significativas no ganho de peso quando comparado ao grupo testemunha. Também não houve diferença no número de ocorrência e nem no tempo em dias dos animais acometidos por diarreia.

Entretanto, quando se compara o número de animais debilitados que tiveram de ser tratados, e o número de óbitos entre os tratamentos, ficou claro que o probiótico proporcionou melhora no sistema de criação.

7. REFERÊNCIA

ALMEIDA, R. F. Suinocultura Industrial, O fim de uma era. São Paulo 2000, v 143, p. 24-27

ÁVILA, F. A. et al. A comparative study of the efficiency of probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. *Revue Élev. Med. vét. Pays Trop.*, n 48, n.3, p 239-243 1995

BERTECHINI, A. G. O, *Fantastico Mundo dos Probióticos: Informe Técnico Biobac: Bio Tecnal.* 1997, 65 p.

CHAVES, A. H. et al. Efeito de estirpe LT 516 de *Lactobacillus acidophilus* como Probiótico para bezerros In: Revista brasileira de zootecnia, São Paulo, n.5, p.1075-1085, 1999.

CORREIA, G. S. S. et al. Efeito do uso de probióticos e antibióticos no rendimento de carcaça de frangos de corte. Disponível em: www.lamorim.com.br Acesso em: 25 de maio de 2002

FERNANDES, P.C.C. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos In: Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, n.31, p.53-69, 2000.

FERREIRA, W.M.; MENEZES, L.D.M.; RIOS, A.M., Uso de probiótico "Paciflor" em dieta para coelhos em crescimento In: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, FEP MVZ Editora, v 47, n.2, p.249-256, 1995.

FONTY, G.; RAIBAUD, P.; GOUET, Manipulation of the gut microflora: experimental approach in animals. France, 1993. p 356-345

FOX, S. M., Probiotics: intestinal inoculantes for production animals. Vet. Med. v. 83, n. 8, p. 806-830, 1988

GONÇALVES S. F.E et al. Avaliação de probióticos desenvolvidos na Universidade Federal do Paraná com frangos de corte Disponível em www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/Nut/NUT044.htm. Acesso em: 25 de maio de 2002.

GUARNER F., SCHAAFSMA G. J., Short Communication: Probiotics. International Journal of Food Microbiology v.39, p. 237-238, 1998

MARTIN, S. A., NISBET D. J. Symposium: direct-fed microbials and rumen fermentation, In: Effect of direct-fed microbials on Rumen Microbial Fermentation, USA, University of Georgia, Athens, 2000, p 1737-1745

MOLETTA, J. L.; PEROTTO D. Efeito do uso de probiótico no desempenho e incidência de diarreia em ternos de corte desmamados precocemente. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Botucatu. XXXV Reunião Anual.. Barueri, SP: Videolar Compact Disc, 1999

MUÑOZ, S.; MEDINA F. V., Comportamiento productivo de cerdos alimentados con un probiótico durante las etapas de cría y engorda; In: Nona técnica. vl 5. Santiago Chile, Edit Universidade del Chile, 1994, p.239-246

NEPOMUCENO, E. S., Antibióticos Intestinais Naturais: Bacteriocinas, In: Simpósio sobre Aditivos na Nutrição Animal, Campinas SP, CBNA, 2000, p. 15-24

NUNES, C. S., In Probióticos microbianos e criação intensiva de animais. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias; v. 89, n. 512, p 166-174,1994.

OUWEHAND, A.C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects, International Dairy Journal, London., n 9. p 43-52, 1999.

PIARD, J. C. et al. Bactérias lácticas. Disponível em: www.bioteecnologia.com.br/bio/8_m.htm. Acesso em: 18 de abril de 2000.

QUINTERO, A. et al. Efecto de los probioticos y sexo sobre el crecimiento de cerdos Disponível em: www.ceacal.ula.ve/AVAPA Acesso em: 25 de maio de 2002.

RUEDA, F. G. et al. Probióticos en nutrición animal. Disponível em: www.mundofree.com/pacogil/probióticos.htm. Acesso em: 30 de março 2000.

SAARELA et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, v.84, p.197-215, 2000

ZANETTI M. A. et al Uso de aditivos em dietas de bezerros holandeses. Disponível em: www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/Nur/NURO16.htm. Acesso em: 25 de junho de 2002.

Apêndice: A

Dados coletados do experimento para análise e discussão.

Nº do Animal	Tratamento	Peso entrada	Peso saída	Ganho de peso em 42 dias	Ocorrência de diarreia	Total de dias com diarreia	Tratamentos c/ antibiótico Injetável	Ingestão de concentrado na última semana em Kg
08	1	32,50	43,50	11,00	3	9	1	
13	1	36,50	41,50	5,00	3	26,5	1	5,103
19	1	32,00	40,00	8,00	4	9	1	5,723
20	1	26,50	39,50	13,00	3	8	1	7,740
24	1	41,00	52,00	10,00	2	11	1	6,597
01*	1	38,50					1	
02*	1	19,00					1	
03*	1	20,00					2	
25*	1	32,00					1	
MEDIAS	30,88	43,30	9,40	3	12,70			6,290
04	2	35,50	42,60	7,10	1	8,5	0	
09	2	35,50	49,00	13,50	4	10,5	0	
15	2	28,50	34,00	5,50	3	10,5	1	3,226
17	2	42,50	47,00	4,50	1	4	1	3,151
18	2	34,00	36,00	2,00	6	18,5	0	6,289
05*	2	29,00					1	
MEDIAS	34,16	41,72	6,52	3	10,40			4,222
07	3	41,50	39,50	-2,00	5	19	1	
11	3	40,00	52,50	12,50	2	9,5	0	
14	3	29,50	35,50	6,00	4	14,5	1	3,235
23	3	30,00	36,50	6,50	2	7,5	0	4,964
229	3	33,50	42,50	9,00	2	6	0	5,421
12*	3	52,50					1	
MEDIAS	37,84	41,30	6,40	3	11,3			4,540
06	4	34,00	42,00	8,00	4	9,5	1	
10	4	36,00	42,00	6,00	4	13	1	
16	4	33,00	41,50	8,50	4	12	1	4,288
22	4	37,00	40,00	3,00	4	11,5	0	5,010
26	4	43,50	58,00	15,50	3	10	0	6,581
21*	4	24,00					1	
MEDIAS	34,58	44,70	8,2	3,8	11,2			5,293

* Animais que vieram a óbito durante o período de experimento.