

LETÍCIA SILVA DE FREITAS

AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM DIETAS PARA LEITÕES DE 21 A 49
DIAS DE IDADE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

LETÍCIA SILVA DE FREITAS

AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM DIETAS PARA LEITÕES DE 21 A 49
DIAS DE IDADE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada em 11 de julho de 2005.

Prof. Dr. Juarez Lopes Donzele
(Conselheiro)

Dr. Ary Ferreira De Freitas
(Conselheiro)

Prof. Dr. Paulo César Brustolini

Prof^a Dr^a Rita Flávia Miranda de Oliveira

Prof. Dr. Darci Clementino Lopes
(Orientador)

A Deus.

*Aos meus pais Ary e Vera, exemplos de vida,
humildade e honestidade.*

À minha irmã e companheira Priscilla.

*Ao meu irmão Marcelo, que me orientou na vida e
na profissão desde os meus primeiros passos na
Universidade.*

À minha cunhada e amiga Andresa.

*Aos meus familiares, e à minha nova família
Freitas, que me adotou incondicionalmente.*

À minha cadela Leslie.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do Curso.

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

Ao Departamento de Zootecnia, do Centro de Ciências Agrárias da UFV, pelo apoio.

À empresa METACHEM Industrial e Comercial Ltda., de Itupeva, SP, por tornar possível a execução deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), por permitir a execução das análises.

Ao Professor Darci Clementino Lopes, pela orientação na execução dos trabalhos.

Aos pesquisadores Ary Ferreira de Freitas e Jaílton da Costa Carneiro, pelas sugestões, pelas críticas e pela orientação.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Labor Clínica Ltda. e ao Laboratório Microvet, pelo suporte técnico.

Aos Professores Juarez Lopes Donzele e Rita Flávia Miranda de Oliveira, pelo apoio e incentivo acadêmico desde os trabalhos de graduação.

Aos membros da banca avaliadora, pelas sugestões e críticas, o que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos da Graduação e da Pós-Graduação Rê, July, Fernanda, Atsuka, Marcelle, Abel, Douglas, Bruno, Lourdes, Fabrício, Ju, Vlad, Leidi, Anderson, Mariana, Márvio, Paulo, Sérgio e Silvano, pela amizade, pelo apoio e pelas sugestões.

À bolsista de iniciação científica Mariana e aos estagiários Rafael, Bárbara e Éder, pelo auxílio na condução do experimento e das análises.

Ao Dedeco e ao Hernani, bem como aos outros funcionários do Setor de Suinocultura e da Granja de Melhoramento Animal do Departamento de Zootecnia da UFV e da Embrapa Gado de Leite, pelo auxílio na conclusão do trabalho.

A Leslie, pelo carinho, os passeios na rua e as brincadeiras nas horas mais difíceis.

À minha cadela Vick (*in memoriam*), por ter sido um dos maiores estímulos para que eu me tornasse uma Médica-veterinária.

Aos 128 leitões, pela paciência e compreensão mesmo diante do sofrimento e estresse causados pelo experimento, pela diversão e por terem feito parte da minha vida durante dois meses.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LETÍCIA SILVA DE FREITAS, filha de Ary Ferreira de Freitas e Vera Lúcia Silva de Freitas, nasceu em Juiz de Fora, MG, em 12 de novembro de 1979.

Em março de 1999, iniciou o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2004.

Em março desse mesmo, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Zootecnia, na área de Nutrição de Monogástricos, da UFV, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE	37

RESUMO

FREITAS, Letícia Silva de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.
Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade.
Orientador: Darci Clementino Lopes. Conselheiros: Ary Ferreira de Freitas e Juarez Lopes Donzele.

Os ácidos orgânicos podem ser um instrumento eficiente na substituição dos antibióticos para prevenir doenças pós-desmame. A utilização de ácidos orgânicos em dietas de leitões foi avaliada em um experimento utilizando 128 leitões desmamados, nos períodos de 21 a 35, 36 a 49 e 21 a 49 dias de idade. Os tratamentos foram constituídos de uma dieta controle, sem ácidos orgânicos, e três grupos suplementados com “blends” à base de ácido láctico principalmente, a 0,78; 0,84; e 0,90% de ácidos orgânicos, no período de 21 a 35 dias; e a 0,59; 0,63; e 0,66%, no período de 36 a 49 dias. Avaliaram-se o consumo de ração médio diário (CRMD), o ganho de peso médio diário (GPMD), a conversão alimentar (CA) e o escore diarreia dos leitões. O CRMD e o GPMD não foram diferentes entre os tratamentos, nos três períodos avaliados. A CA dos leitões que receberam a dieta com 0,84% de ácidos orgânicos foi melhor que a daqueles que receberam as dietas-controle e com 0,90% de ácido, no período de 21 a 35 dias. Observou-se efeito dos tratamentos sobre o escore fecal nos três períodos experimentais. Os leitões que receberam a ração com 0,84% de ácidos orgânicos apresentaram menor escore fecal em relação aos alimentados com ração com 0,90% desses ácidos. Amostras de digesta e de sangue foram coletadas para dosar a

concentração de ácido láctico no trato digestivo e no plasma, respectivamente, de leitões aos 35 dias de idade. Os tratamentos não influenciaram a concentração de ácido láctico no trato digestivo. A concentração desse ácido no plasma dos animais que receberam as dietas com ácido orgânico não variou. Entretanto, essa concentração no plasma dos animais que receberam as dietas com 0,78 e 0,84% não diferiu do tratamento controle, mas a daqueles que receberam 0,90% sim, aumentando em 60,61% a concentração de ácido láctico em relação ao grupo controle. Isolaram-se bactérias das fezes dos animais, para identificar os possíveis microrganismos presentes no ambiente. O tratamento que correspondeu à inclusão de níveis de ácidos orgânicos de 0,84 e 0,63%, respectivamente, nas fases de 21 a 35 e 36 a 49 dias de idade, foi o mais eficiente, considerando-se que não foram isoladas das fezes dos leitões as bactérias *E. coli a*-hemólise e *Streptococcus* sp. A utilização de ácidos orgânicos na alimentação animal proporciona melhor conversão alimentar com a suplementação de 0,84% de ácidos orgânicos no período de 21 a 35 dias e melhor consistência de fezes e controle de *E. coli a*-hemólise e *Streptococcus* sp. com a suplementação de 0,84 e 0,63% de ácidos no período de 21 a 49 dias.

ABSTRACT

FREITAS, Letícia Silva de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005. **Organic acids evaluation in diets of piglets age 21 to 49 days old.** Adviser: Darci Clementino Lopes. Committee members: Ary Ferreira de Freitas and Juarez Lopes Donzele.

Organic acids can be a efficient tool to antibiotics substitution to prevent post-weaning diseases. The utilization of organic acids in piglets' diets was evaluated in an experiment using 128 weaned piglets, in the 21 to 35 day, 36 to 49 day and 21 to 49 day old periods. The treatments were constituted by a control diet, without organic acids, and three groups supplemented with blends based mostly in lactic acid, at 0.78, 0.84 and 0.90 % of organic acids in the 21 to 35 day period and 0.59, 0.63 and 0.66% in the 36 to 49 day period. Piglets' average daily feed intake (ADFI), average daily weight gain (ADWG), feed conversion ratio (FCR) and diarrhea scores were evaluated. The ADFI and the ADWG were not different in the treatments in the three evaluated periods. The FCR of piglets that received a diet with 0.84 % of organic acids were better than the control and 0.90 % diets, in the 21 to 35 day period. A effect of the treatments were observed in the diarrhea scores in the three experimental periods. The piglets that received the diet with 0.84 % of organic acids had lower diarrhea score than 0.90 %. Digesta and blood samples were collected to dose lactic acid concentration in digestive tract and in plasma, respectively, in piglets with 35 days old. The treatments had no influence in lactic acid concentration in the digestive tract. The plasma lactic acid

concentration of the animals that received organic acids diets did not varied. However, the plasma lactic acid concentration of the animals that received 0.78 and 0.84 % did not differ from control treatment, but the concentration of 0.90 % diet differed, increasing the concentration of lactic acid 60.61 %, comparing to control group. A bacterial isolation was made from animals' feces to identify the environment's possible microorganisms. The treatment corresponding the inclusion of 0.84 and 0.63 % organic acids levels, in the 21 to 35 days and 36 to 49 days old respectively, were more efficient considering that the *E. coli* **a**-hemolytic and *Streptococcus sp* bacterias was not isolated from piglets' feces. Organic acids utilization in piglets diets afford a better feed conversion rate supplementing 0.84 % of organic acids in the 21 to 35 days period, and better diarrhea score and *E. coli* **a**-hemolytic and *Streptococcus sp* control supplementing 0.84 and 0.63 % of acids in the 21 to 49 days period.

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira tem se destacado nos últimos anos pela sua produtividade, especialmente em razão dos avanços na nutrição, sanidade e melhoramento animal. Entretanto, vem apresentando algumas dificuldades no sistema de produção, como na fase pós-desmame, devido à alta taxa de mortalidade.

Os animais, nessa fase, são submetidos a várias mudanças súbitas, como alteração na alimentação e no ambiente, além da perda de fatores imunológicos maternos, que podem proporcionar aos leitões uma hipersensibilidade transitória no intestino e, conseqüentemente, perda de peso, aparecimento de doenças, sobretudo a diarréia pós-desmame e a doença do edema.

O pH no trato digestivo de leitões recém-desmamados é maior comparando-se ao de adultos, o que afeta intensamente a fisiologia do animal. A digestão dos nutrientes é reduzida pela baixa atividade enzimática no trato digestivo, resultando em diarréia osmótica, além de alterar morfológicamente a estrutura da mucosa intestinal e tornar o animal suscetível a doenças infecciosas. As conseqüências dessas alterações indicam a necessidade de apresentar alternativas viáveis que minimizem os principais problemas da indústria suinícola moderna.

O antibiótico tem sido muito utilizado ao longo dos anos, no entanto hoje existe um consenso em relação à não-utilização de antibióticos, os quais resultam em resistência das bactérias que podem afetar tanto os animais quanto os homens. Assim, devido à crescente exigência de órgãos de saúde mundiais e de países importadores da

carne suína brasileira, alguns aditivos têm sido testados, na busca de se chegar a uma alternativa com eficiência próxima à dos antibióticos.

Os ácidos orgânicos têm sido apontados como os aditivos mais promissores na substituição de antibióticos, tendo demonstrado bons resultados produtivos e poucos efeitos colaterais, por não serem tóxicos ao homem.

O ácido láctico é de cadeia curta e por ser fraco, segundo alguns estudos, pode estar entre os ácidos disponíveis no mercado mais efetivos na prevenção de doenças. Os ácidos fracos têm maior atividade antimicrobiana no estômago, pois, com sua constante de ionização (pK_a) relativamente maior, apresentam-se em maior concentração na forma não-ionizada em um mesmo pH do que um ácido forte. O ácido não-ionizado se difunde através da membrana da bactéria e, em seu interior, dissocia-se, causando acidificação do citossol, comprometimento da atividade celular e morte da bactéria.

A ação mais efetiva dos ácidos é provavelmente a atividade antimicrobiana, além da modificação da flora intestinal, mediante a produção de um meio favorável para bactérias lácticas, que promovem benefícios ao organismo do animal e podem, também, causar-lhe queda de pH no seu lúmen intestinal.

Diante do exposto, propôs-se este trabalho^{*}, que teve por objetivo avaliar os efeitos da inclusão de ácidos orgânicos na dieta de leitões sobre o desempenho e a incidência de diarreia nesses animais dos 21 aos 49 dias de idade.

* Parcialmente financiado pela empresa METACHEM Industrial e Comercial Ltda., de Itupeva, SP.

REVISÃO DE LITERATURA

A fase pós-desmame de suínos tem representado um desafio considerável para o criador, pela perda econômica devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, e, portanto, sido crítica para a indústria suinícola. Os suínos são submetidos, nessa fase, à mudança de alimentação, perda de fatores imunológicos maternos e mudança de ambiente (TSILOYIANNIS et al., 2001b). A associação desses fatores pode proporcionar aos leitões diarreia, perda de peso e maior suscetibilidade às doenças.

A mudança no padrão de qualidade nutricional do alimento, quando a caseína é substituída pela proteína da soja, pode provocar reações de hipersensibilidade transitória no intestino (TEIXEIRA et al., 2003; SILVA, 2004). Dessa forma, as condições no trato digestivo favorecem a multiplicação de microrganismos indesejáveis, que estão presentes no ambiente, sobretudo após a formação de lotes com outros leitões.

A insuficiência de enzimas digestivas nessa fase de desenvolvimento dos leitões, a capacidade reduzida de absorção devido à arquitetura dos vilos, a secreção gástrica mal desenvolvida e o baixo consumo de ração podem reduzir a capacidade metabólica e limitar o crescimento até a fase de terminação (CORASSA, 2004). Assim, é evidente a necessidade de efetuar pesquisas para apontar alternativas nutricionais que minimizem os prejuízos causados pelas bactérias patogênicas.

Leitões contêm, no muco, receptores protéicos e glicolipídicos específicos para fímbria K88 (BLOMBERG et al., 1993). Fímbrias são filamentos de polímeros de proteína, curtos e retos, pelos quais se aderem aos carboidratos de superfície da mucosa do trato gastrointestinal. De acordo com Blumenstock e Jann (1982), alguns tipos de

fímbrias de bactérias patogênicas possuem afinidade às moléculas de manose da borda em escova.

A *Escherichia coli* (*E. coli*), bactéria oportunista que vive no trato gastrointestinal de suínos, pode apresentar fímbria K88 e, em condições favoráveis para o seu desenvolvimento, aderir à mucosa intestinal. A *E. coli* K88⁺ β-hemolítica pode causar a redução da taxa de crescimento dos animais e, possivelmente, aumento da mortalidade devido à diarreia pós-desmame e à doença do edema (PLUSKE et al., 1997; TSILOYIANNIS et al., 2001a).

O aparecimento da diarreia pós-desmame ocorre normalmente em torno de três dias após a mudança da alimentação. A insuficiência de enzimas resulta em baixa digestão dos nutrientes, que são provenientes de alimentos indispensáveis na alimentação de suínos, e conseqüentemente aumenta a osmolaridade do conteúdo do trato digestivo, provocando diarreia osmótica. A questão é que a diarreia torna o animal suscetível a infecções secundárias, principalmente nessa fase em que a secreção de ácido clorídrico (HCl) é baixa e, segundo Pluske et al. (1997), há também redução da fagocitose, da secreção de IgA e outras imunoglobulinas, da lisozima, de linfócitos e oligossacarídeos.

A secreção de HCl é baixa (MANNERS, 1976; SCIPIONI et al., 1978; BURNEL et al., 1988), porque os animais acabaram de sair da fase de amamentação, em que o pH gástrico é mais elevado do que nos animais adultos, cuja finalidade é não permitir a degradação de imunoglobulinas, no entanto protege menos os animais contra agentes infecciosos.

A mudança no tipo da dieta também é extremamente importante na patologia da diarreia, pois pode modificar a perda de enterócitos da vilosidade e a proliferação de células da cripta. Ocorrem aumento no número de células secretoras dos enterócitos e diminuição das células absorptivas, e conseqüentemente haverá redução na absorção dos nutrientes, incentivando a diarreia osmótica (PLUSKE et al., 1997), causando a desidratação do animal (ENGLISH et al., 1979).

Os nutrientes não absorvidos são substratos para cepas de *E. coli* enterotoxigênicas, e o aumento da produção de enterócitos disponibiliza mais receptores para a *E. coli* se ligar, mesmo as que não possuem fímbria K88 (PLUSKE et al., 1997). Isso significa que a alimentação à vontade favorece a *E. coli* (THOMLINSON; LAWRENCE, 1981).

A colonização da *E. coli* resulta no aparecimento de diarreia infecciosa (TZIPORI et al., 1980) e causa o encurtamento da vilosidade e aumento da profundidade de cripta e do “turnover” dos enterócitos. A menor atividade das enzimas, principalmente a lactase e a sacarase, também ocorre, pois estão localizadas na borda da escova dos enterócitos, região mais afetada do vilo (PLUSKE et al., 1995).

Os danos causados ao intestino estão associados à redução de ganho de peso dos animais, porque a dieta e a microflora influenciam as estruturas de carboidrato da mucosa e os glicoconjugados da mucina de alguns aminoácidos, como a glutamina, que é muito utilizada pelos enterócitos para seu metabolismo e para a síntese de nucleotídeos (PLUSKE et al., 1997). Assim, a exigência de glutamina e outros aminoácidos no epitélio intestinal pode aumentar.

A doença do edema e a gastroenterite causada pela *E. coli* têm chamado muito a atenção dos suinocultores, por serem as causas mais freqüentes de perda econômica (THOMLINSON; LAWRENCE, 1981).

A doença do edema ocorre uma a duas semanas após o desmame e é causada pela infecção com cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, que aderem em fragmentos da borda em escova dos enterócitos no intestino delgado e, de acordo com Silva et al. (2001), produz uma toxina termolábil da família da toxina Shiga, também denominada verotoxina. As toxinas afetam as pequenas artérias, causando uma angiopatia degenerativa, que resulta em edema em vários locais, notavelmente nas pálpebras, estômago e cólon, combinado com sinais nervosos em um número variável de animais (TSILOYIANNIS et al., 2001a).

É razoável que outros fatores possam afetar a microflora. Assim, é importante promover oportunidades para manipular essas variáveis para aumentar a produtividade e diminuir alguns aspectos prejudiciais do sistema produtivo (FRANKLIN et al., 2002). Os antibióticos têm sido utilizados amplamente com a finalidade de contornar esse problema, não se considerando, contudo, as conseqüências de sua utilização.

A aplicação de subdoses de antibióticos aos animais, a freqüência incorreta da droga ou a suspensão de tratamentos, além da utilização de antibióticos como promotores de crescimento, podem resultar na resistência das bactérias aos princípios ativos. Segundo Corassa (2004), pode ocorrer a transferência desses genes da microbiota animal para a humana (resistência cruzada), além da presença de resíduos em carnes, ovos e leite.

A utilização de antibióticos na União Européia está limitada e tendendo a extinguir o uso como promotores de crescimento, e o Brasil, como exportador de produtos de origem animal para esse mercado, deve adotar essa medida.

O impacto desse fenômeno e suas conseqüências na saúde pública têm elevado a atenção de organizações como a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) e o Codex Alimentarius. Em países onde a segurança alimentar tem sido amplamente discutida, têm-se estabelecido planos de controle de produção, comercialização e utilização de antibióticos na produção animal, com proibições e, ou, limitações de uso de muitos princípios ativos (CORASSA, 2004).

Conseqüentemente, o interesse em desenvolver alternativas potenciais aos antibióticos tem crescido. Segundo Greko (2001), evidências indicam que o não-uso de antibióticos tem sido efetivo em populações animais, reduzindo o risco de expansão da resistência através da cadeia alimentar.

A resposta dos animais pode ser melhorada através da suplementação com diversos tipos de aditivos, como a suplementação de prebióticos, probióticos, simbióticos e ácidos orgânicos (JENSEN, 1998; CORASSA, 2004). Entre as alternativas atuais disponíveis, os ácidos orgânicos vêm sendo apontados como estratégia nutricional eficiente (PARTANEN; MROZ, 1999; TSILOYIANNIS et al., 2001a).

A suplementação de dietas com ácidos orgânicos, ou seus sais, tem reduzido a freqüência de diarreia e melhorado o desempenho de leitões (GIESTING; EASTER, 1985; KNARREBORG et al., 2002), especialmente nas duas primeiras semanas que seguem ao desmame. No entanto, é necessário encontrar uma formulação com a eficácia comparável ao antibiótico. Assim, a variedade de ácidos e suas doses devem ser investigadas.

Os ácidos orgânicos incorporados na dieta ou na água de beber têm prevenido a doença do edema pós-desmame (THOMLINSON; LAWRENCE, 1981). A inclusão de uma concentração relativamente baixa de ácidos orgânicos é capaz de eliminar a *Salmonella* spp. trazida por frangos em crescimento (HINTON et al., 1985).

O ácido láctico, um insaturado e não-volátil ácido carboxílico com três carbonos e também produzido em meio anaeróbico do trato gastrointestinal através da fermentação bacteriana (EWASCHUK et al., 2002), tem demonstrado efeito positivo no controle da doença do edema, melhorando a utilização da dieta e o desempenho de

leitões desmamados e reduzindo a porcentagem de mortalidade (TSILOYIANNIS et al., 2001a).

Cole et al. (1968) testaram o efeito do ácido láctico, adicionado na água de beber a 0,8%, sobre o desempenho e flora bacteriana de leitões desmamados. O tratamento foi efetivo no controle de *E. coli* hemolítica e na redução do número de *E. coli* não-hemolítica no duodeno e jejuno. Os animais cresceram significativamente mais rápido que o tratamento-controle, com um ganho de peso e um consumo 34 e 13% maior que o controle, respectivamente, e a média da conversão alimentar com 17% a menos.

Os ácidos orgânicos atuam diminuindo o pH intestinal e, conseqüentemente, estimulando a conversão de pepsinogênio em pepsina, aumentando a digestibilidade da proteína (GIESTING; EASTER, 1985; RISLEY et al., 1991; PARTANEN; MROZ, 1999; SANTOS et al., 2003). Com a redução do pH intestinal, diminui a proliferação de *E. coli* e outros microrganismos patogênicos, os quais competiriam com o animal pelos nutrientes, além de causarem inúmeros distúrbios no trato gastrointestinal. Esse efeito inibitório de coliformes coincide com a melhora do desempenho de leitões (KNARREBORG et al., 2002).

Segundo Gauthier (2003), a inclusão de ácidos e sais orgânicos entre 1 e 2% na ração pode reduzir o pH estomacal e a proliferação de microrganismos patogênicos no trato digestivo, bem como melhorar o ganho de peso diário e a conversão alimentar dos leitões.

Thomlinson e Lawrence (1981), estudando a utilização de ácido láctico na água de beber ou incorporado na ração peletizada de suínos com cinco semanas de idade com cânula gástrica, observaram redução do pH gástrico. A adição de ácido láctico retardou a multiplicação de *E. O141:K85*, com a correspondente diminuição da mortalidade.

É importante salientar a respeito da capacidade tamponante (*B-value*) de alimentos ou de rações que podem reduzir a eficiência de utilização dos acidificantes. Alimentos com baixo *B-value* ajudam a ativação do pepsinogênio e, portanto, na digestibilidade da proteína e na queda da proliferação de bactérias patogênicas (ROTH, 2000).

O fornecimento de ácido láctico para leitões, segundo Tsiloyiannis et al. (2001a), pode aumentar o ganho de peso diário em 14,04% em relação a animais que não o recebem, e o consumo de ração diário em 7,27% devido ao aumento da taxa de crescimento e à melhora da saúde dos animais, bem como melhorar a conversão alimentar em 6,8%.

O ácido láctico vem sendo amplamente aplicado na indústria alimentar e outros tipos, como a farmacêutica, e tem papel-chave no sabor, na textura, na conservação e na segurança dos produtos (LIU, 2003). A expectativa é de que o mercado do ácido láctico cresça 8,6% anualmente, e somente nos Estados Unidos espera-se uma demanda de 49.600 MT (LISA, 2001).

O ácido láctico possui dois enantiômeros, entre eles o isômero l, que é utilizado pelo metabolismo devido à presença da enzima lactato desidrogenase (EWASCHUK et al., 2002; NAVEENA et al., 2005), convertendo lactato em piruvato e não causando efeito tóxico tanto no homem quanto no animal. Os isômeros produzidos dependem da espécie bacteriana, a exemplo de *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Carnobacterium*, que produzem l-ácido láctico, enquanto *Leuconostoc* produz d-ácido láctico (LIU, 2003), mas a síntese química resulta em uma mistura racêmica.

Gravesen et al. (2004), estudando a diferença do efeito inibitório do d e l-ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes*, verificaram maior sensibilidade da bactéria ao d do que ao l-ácido láctico. Entretanto, a inativação de cepas de *E. coli* é consideravelmente maior pelo l-ácido láctico do que o d-isômero (Mc WILLIAM LEITCH; STEWART, 2002), apesar de a penetração do ácido láctico através da membrana celular ser idêntica em ambos os isômeros.

O nível do ácido orgânico pode afetar o desenvolvimento da *E.* (PRESSER et al., 1997; TSILOYIANNIS et al., 2001a), principalmente no estômago (CANIBE et al., 2001; KNARREBORG et al., 2002), devido à ação antimicrobiana dos ácidos, capazes de penetrar no interior da bactéria e comprometer seu metabolismo, atuando de forma efetiva (BOLDUAN et al., 1988, citado por CANIBE et al., 2001). O ácido orgânico também causa queda de pH, especialmente no intestino, exibindo efeito bactericida sobre os coliformes (RISLEY et al., 1992; TSILOYIANNIS et al., 2001a; KNARREBORG et al., 2002), e tem sido efetivo na conservação de matérias-primas e rações (PARTANEN; MROZ, 1999; SANTOS, 2003), inibindo, também, a proliferação de fungos.

As matérias-primas utilizadas na fabricação de rações geralmente, devido ao armazenamento inadequado, contêm esporos de fungos e bactérias, podendo transmitir várias doenças aos animais. Segundo Kuana (2001), com o advento das regulamentações de segurança alimentar e exigências do consumidor, o controle de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva da carne tem merecido destaque, induzindo as indústrias a implantar programas de Boas Práticas de Fabricação e de Análise de

Perigos e Pontos Críticos de Controle para controle de *Salmonella*, inclusive, nas fábricas de rações, para controle de diversas bactérias e fungos.

Em vários estudos foi observado que a forma protonada do ácido láctico atravessa a membrana plasmática das células por difusão passiva (HUNTER; SEGEL, 1973; PRESSER et al., 1997; PARTANEN; MROZ, 1999; ROTH, 2000; CANIBE et al., 2001; SILVA, 2004; GRAVESEN et al., 2004; HALM et al., 2004). Uma vez no interior da bactéria, o ácido láctico protonado se dissocia devido ao pH intracelular acima do valor da constante de ionização (pK_a) do ácido láctico, de valor 3,858 (DEAN, LANGE, 1985; HALM et al., 2004), causando acidificação do citossol (GRAVESEN et al., 2004).

As bactérias, para neutralizar essa acidificação, irão aumentar a atividade da bomba ATPase da membrana plasmática e, assim, aumentar a expulsão de prótons (HOLYOAK et al., 1996). Em altas concentrações de ácido láctico, o aumento da atividade da bomba ATPase irá resultar em uma perda significativa de energia disponível para o crescimento e outras funções metabólicas essenciais, e com o tempo não será possível para a célula manter seu pH intracelular com um limite fisiológico aceitável, resultando primeiramente na inibição do crescimento e, finalmente, morte celular (HALM et al., 2004). A síntese de DNA e RNA também é inibida, debilitando a célula e tornando-a incapaz de recompor o equilíbrio de energia e dar continuidade aos processos de multiplicação (SILVA, 2004).

Halm et al. (2004), estudando a tolerância de células de *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisiae* ao ácido láctico, verificaram que a perfusão de 106,4 mM desse ácido causou considerável acidificação do citossol após aproximadamente um minuto da queda de pH intracelular de 7,5 para 6,4, e depois de três minutos o pH reduziu para 5,5, assim permanecendo durante o experimento.

A tolerância das bactérias aos ácidos, segundo Holyoak et al. (1996), depende da capacidade tamponante do citossol, da atividade da bomba ATPase e, de acordo com Palenzuela (2000), do mecanismo de descarboxilação dos aminoácidos glutamato, lisina e arginina, que têm papel importante na resistência ao ácido orgânico.

Em baixo pH, o sistema glutamato descarboxilase (GAD) converte a molécula de glutamato extracelular em δ -aminobutirato (GABA) extracelular, consumindo próton intracelular (COTTER et al., 2001), e a presença de glutamato na dieta estimula a expressão do GAD (SANDERS et al., 1998). Esse mecanismo favorece o desenvolvimento de bactérias lácticas em baixo pH, no entanto, segundo Hersh et al.

(1996), esse sistema está presente na *E. coli* e tem demonstrado resistência a ácidos associados à suplementação com glutamato.

Os mecanismos de descarboxilação da lisina e a arginina são semelhantes aos do glutamato. Em todos os casos, há consumo de prótons intracelulares para a conversão de cada molécula de lisina em cadaverina e de arginina em agmatina. A queda de pH também resulta em acúmulo de importantes proteínas reguladoras que consomem próton intracelular, a RpoS e a PhoP, responsáveis pelo controle de distintos conjuntos de genes relacionados com a proteção e reparação de macromoléculas (PALENZUELA, 2000).

Ensaio colorimétrico e PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) não indicaram atividade da GAD em nenhuma das bactérias isoladas (CASEY et al., 2004), mas tem sido demonstrado atividade da GAD em *Lactobacillus brevis* (UENO et al., 1997), o que fornece maior tolerância à bactéria láctica em condições ácidas, como *Lactobacillus Lactis* e *Lactobacillus monocytogenes* (SANDERS et al., 1998; COTTER et al., 2001).

A eficiência de um ácido depende do seu pK_a , ou valor de pH em que 50% do ácido se encontra na forma dissociada. Ácidos com alto valor de pK_a são mais efetivos, como o ácido láctico, que é fraco (PARTANEN; MROZ, 1999).

O ácido acético é inibidor das bactérias em menores concentrações que o ácido láctico em razão, provavelmente, do seu valor de pK_a maior ($pK_a=4.74$), o que significa que, em um mesmo pH, tem-se mais ácido acético protonado presente, que poderia ser encontrado numa mesma concentração de ácido láctico (HALM et al., 2004).

Condições ácidas no trato gastrointestinal têm efeito bactericida em bactérias potencialmente prejudiciais, através da produção de um ambiente mais favorável para os lactobacilos (TSILOYIANNIS et al., 2001a). Os lactobacilos, ácido-tolerantes, desenvolvem-se melhor em meio ácido (MATHEW et al., 1996; FRANKLIN et al., 2002) que qualquer outra bactéria intestinal (BONGAERTS et al., 2005), o que é extremamente importante, já que possuem efeito positivo no organismo do animal (CORASSA, 2004). De acordo com Casey et al. (2004), os lactobacilos exibem grande variação em suas habilidades para sobreviver no meio com suco gástrico simulado com pH 1,85. Segundo Canibe et al. (2001), até mesmo a ação antimicrobiana dos ácidos é menor sobre os lactobacilos.

A alteração da microflora intestinal está entre os principais efeitos dos ácidos orgânicos (SCIPIONI et al., 1978; BURNELL et al., 1988). Esses microrganismos podem influenciar a saúde do animal, o tratamento de dejetos, e até mesmo os

patógenos originados de alimentos. Atualmente, em suínos a caracterização da microflora e seus produtos têm se limitado em somente alguns sítios no trato gastrointestinal, mas ainda há poucas informações sobre o efeito dos componentes da dieta, do desmame, dos estressores e das terapias (FRANKLIN et al., 2002).

As fezes são um bom indicador de mudanças da flora bacteriana intestinal de leitões, por meio da coleta de amostras fecais frescas (CANIBE et al., 2001). Knarreborg et al. (2002), testando efeito de vários ácidos orgânicos, entre eles o ácido láctico, sobre os coliformes e bactérias lácticas em leitões, verificaram que os coliformes, em contraste com as bactérias lácticas, foram incapazes de crescer no conteúdo estomacal em pH 4,5. No entanto, os lactobacilos foram notavelmente não afetados.

As bactérias lácticas têm demonstrado grande importância no controle de diversos microrganismos indesejáveis e patogênicos (KNARREBORG et al., 2002; YOON et al., 2005), pelo mecanismo de exclusão competitiva, através do bloqueio de receptores intestinais para *E. coli*, secretando metabólitos que atuam contra bactérias Gram-negativas (TSILOYIANNIS et al., 2001a), como a Lactocidina (VINCINT et al., 1959) e o próprio ácido láctico.

A capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos, por fermentarem os carboidratos presentes nos alimentos (EWASCHUK et al., 2002) e, conseqüentemente, reduzirem o pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas.

As bactérias lácticas estimulam a imunidade do animal (JENKINS et al., 1999; CORASSA, 2004; ROOLER et al., 2004), pelo aumento do número de linfócitos T e B no baço (PEDROSO, 1999), de macrófagos (FERES, 2003; CORASSA, 2004), da fagocitose e da produção de imunoglobulinas (WOODCOCK et al., 2004). Os lactobacilos também atuam reduzindo o número de bactérias produtoras de toxinas e amônia, através da diminuição da concentração de bactérias desaminadoras e urease-positivas por competição (BOANGAERTS et al., 2005), o que resulta na diminuição das enfermidades devido à agressão à mucosa respiratória e, conseqüentemente, melhora na produtividade (PEDROSO, 1999).

Essas questões devem estar em mente ao considerar as conseqüências do uso de determinado aditivo, mas é possível que existem vários efeitos ainda desconhecidos que influenciam o organismo do animal.

Além da *E. coli*, os *Streptococcus* sp. têm recebido atenção, pois uma única espécie estreptocócica pode ser responsável por uma variedade de doenças (DAVIS et al., 1973), porém, ao contrário dos coliformes, os microrganismos como *Streptococcus* sp. são mais resistentes a meios ácidos (RISLEY et al., 1991).

Os níveis de inclusão dos ácidos devem ser compatíveis com as características do ácido, a fim de respeitar o equilíbrio ácido-base do organismo dos animais.

Os ácidos em excesso podem apresentar um risco, pois ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal têm demonstrado induzir injúria dose-dependente na mucosa de ratos recém-nascidos, assemelhando-se à patologia da enterocolite necrótica neonatal, e também podem resultar em efeito deletério na integridade da mucosa, em malabsorção de carboidratos e motilidade gastrointestinal pobre (LIN et al., 2002).

A taxa de absorção dos ácidos orgânicos depende de seus pK_a e do pH do trato digestivo. Assim, o ácido láctico é absorvido quando o pH está abaixo do valor do seu pK_a . Como o pH do conteúdo do intestino está entre 6 e 8, maior que o valor do pK_a , o ácido se encontra dissociado, na forma pouco absorvida, entretanto ocorre uma queda no valor do pH na superfície absorptiva, devido à troca iônica (Na-H) exercida pelas células do epitélio, transformando-os nas formas protonada e absorvida (PIVA et al., 2001).

O ácido láctico é prontamente metabolizado a piruvato (PARTENEN; MROZ, 1999) nos rins e no fígado, e a tendência é não estar presente no sangue em concentrações altas, no entanto o ácido láctico é metabolizado relativamente devagar e pode se acumular no sangue, em níveis neurotóxicos (EWASCHUK et al., 2002), e comprometer o equilíbrio ácido-base do organismo.

Por meio do exame do sangue é possível ter uma idéia do estado ácido-base do organismo. No pH normal do sangue, o ácido láctico encontra-se praticamente todo sob a forma de lactato, devido ao seu pK_a (VIEIRA et al., 1995).

Acidose metabólica é o aumento da concentração do íon hidrogênio no sangue que ocorre na presença de um ácido e pode resultar na morte do animal, devido a alterações na estrutura e funções das proteínas que são essenciais ao organismo (EWASCHUK et al., 2002).

A manutenção do pH pelo organismo do animal pode ser feita por meio de sistemas-tampão e pelos pulmões e rins. O íon bicarbonato (HCO_3^-) é deslocado para se transformar em ácido carbônico (H_2CO_3), produzindo água (H_2O) e gás carbônico (CO_2) e reduzindo os teores de HCO_3^- . Os quimiorreceptores situados no arco aórtico e no seio

carotídeo detectam aumento da pressão de CO_2 e estimulam o centro respiratório, aumentando a ventilação pulmonar para eliminar o CO_2 pelos pulmões e reduzir os teores de H_2CO_3 (CANTAROW; SCHEPARTZ, 1967; VIEIRA et al., 1995).

É possível, assim, ter uma regulação rápida da queda de pH, no entanto temporária (CANTAROW; SCHEPARTZ, 1967), mas os rins, que são responsáveis pela excreção de prótons (H^+) e ácidos orgânicos na forma iônica e pela maior reabsorção de HCO_3^- filtrado no glomérulo (VIEIRA et al., 1995). A amônia, sintetizada a partir da glutamina pela ação da glutaminase nos rins, combina-se com H^+ para auxiliar a excreção dos prótons (CANTAROW; SCHEPARTZ, 1967; VIEIRA et al., 1995), e, dependendo da duração do abaixamento de pH, há indução de síntese de glutaminase nas células renais (VIEIRA et al., 1995).

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um experimento para avaliar os efeitos da utilização de ácidos orgânicos em dietas sobre o desempenho de leitões de 21 a 49 dias de idade, sob condições de desafio sanitário. O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, no período de maio a julho de 2004.

Foram utilizados 128 leitões, de ambos os sexos, desmamados aos 21 dias de idade, em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro tratamentos com diferentes níveis de ácidos orgânicos, oito repetições e quatro animais por unidade experimental. Foram adotados o peso e o parentesco dos leitões, como critérios na formação dos blocos.

O experimento foi dividido em três períodos, 21 a 35 dias, 36 a 49 dias e 21 a 49 dias, nos quais foram utilizadas dietas, formuladas à base de milho e farelo de soja, para atender às exigências nutricionais dos animais de acordo com recomendações de Rostagno et al. (2000). Em cada fase, os tratamentos foram constituídos por dietas isoprotéicas, isoenergéticas e isolisínicas. As composições centesimais e nutricionais das dietas basais nas duas fases estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Foram adicionados “blends” de ácidos orgânicos, constituídos principalmente de ácido láctico, nas dietas experimentais em substituição ao amido. As composições dos “blends” utilizados foram: Blend I: 50% de ácido láctico, 10% de ácido fórmico e 5% de ácido fosfórico; Blend II: 55% de ácido láctico, 10% de ácido acético e 5% de ácido fosfórico; e Blend III: 48% de ácido láctico, 7% de ácido fórmico e 5% de ácido fosfórico. Os níveis de inclusão dos “blends” nos diferentes períodos e concentração de ácidos orgânicos das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 1 – Composição porcentual das dietas basais dos dois períodos

Table 1 – Percentual composition of basal diets in the two periods

Ingredientes	Períodos (Periods)	
	21 a 35 Dias (21 to 35 days)	36 a 49 Dias (36 to 49 days)
Milho (<i>Grain corn</i>)	27,900	40,500
Milho pré-cozido (<i>pre-gelatinized corn</i>)	15,000	9,500
Farelo de soja 45% (<i>Soybean meal</i>)	17,000	17,800
Soro de leite em pó (<i>Dried whey milk</i>)	9,500	5,500
Leite desnatado em pó (<i>Skim dried milk</i>)	10,000	7,500
Açúcar (<i>Sugar</i>)	6,000	6,000
Farinha de peixe 55% (<i>Fish flour</i>)	3,450	2,500
Plasma (<i>Plasm</i>)	5,000	5,000
Óleo de soja (<i>Soybean oil</i>)	1,450	1,100
Calcário (<i>Limestone</i>)	0,441	0,510
Fosfato monobicálcico (<i>Mono-dicalcium phosphate</i>)	0,800	0,980
Sal comum (<i>Salt</i>)	-	0,050
L- Lisina HCl (79%) (<i>L-Lysine HCl</i>)	0,496	0,390
DL- Metionina (99%) (<i>DL-Methionine</i>)	0,256	0,039
L- Treonina (<i>L-Threonine</i>)	0,129	0,112
L- Triptofano (<i>L-Thryptophan</i>)	0,068	0,009
Cloreto de colina (<i>Choline chlorine</i>)	0,035	0,035
Mistura vit.+aditivos ¹ (<i>Vitamin mix</i>)	0,100	0,100
Mistura mineral ² (<i>Mineral mix</i>)	0,100	0,100
Óxido de zinco (<i>Zinc oxide</i>)	0,300	0,300
BHT (<i>BHT antioxidant</i>)	0,010	0,010
Amido (<i>Starch</i>)	1,965	1,965
Total	100,000	100,000

¹ Conteúdo/kg de ração (*Content/kg of the diet*): vitamina A – 6.000 UI; vitamina D₃ – 1.500 UI; vitamina E -15 UI; vitamina K₃ – 1,5 mg; vitamina B₁ – 1,35 mg; vitamina B₂ - 4 mg; vitamina B₆ - 2 mg; vitamina B₁₂ – 20 mg; ácido fólico – 0,75 mg; ácido nicotínico - 20 mg; ácido pantotênico – 9,35 mg; biotina – 0,08 mg; e selênio – 0,300 mg.

² Conteúdo/kg de ração (*Content/kg of the diet*): ferro - 100 mg; cobre - 10 mg; cobalto - 1 mg; manganês – 40 mg; zinco - 100 mg; e iodo – 1,5 mg.

Tabela 2 – Composição nutricional das dietas basais dos dois períodos

Table 2 – Nutritional composition of basal diets in the two periods

Nutrientes (<i>Nutrients</i>)	Períodos (<i>Periods</i>)	
	21 a 35 Dias (<i>21 to 35 days</i>)	36 a 49 Dias (<i>36 to 49 days</i>)
E. metabolizável (<i>Metbolizable energy</i>) kcal/kg	3383	3359
Proteína bruta (<i>Crude protein</i>) %	21,99	20,85
Lactose (<i>Lactose</i>) %	12,12	7,875
Lisina total (<i>Total lisine</i>) %	1,786	1,598
Lisina dig. (<i>Digestive lisine</i>) %	1,199	1,062
Metionina dig. (<i>Digestive methionine</i>) %	0,372	0,280
Treonina dig. (<i>digestive Threonine</i>) %	0,779	0,624
Triptofano dig. (<i>Digestive thryptonphan</i>) %	0,234	0,170
Fósforo disponível (<i>available phosphorus</i>) %	0,524	0,478
Cálcio (<i>Calcium</i>) %	0,799	0,752
Sódio (<i>Sodium</i>) %	0,284	0,257

Tabela 3 - Níveis de inclusão dos “blends” nos diferentes períodos e concentração de ácidos orgânicos das dietas experimentais

Table 3 – Blends inclusion levels in the defferents periods and organic acids concentration in the experimental diets

Tratamentos (<i>Treatments</i>)	Blend (<i>blend</i>)	Níveis de Inclusão (<i>Inclusion levels</i>) %		Concentração de Ácidos Orgânicos das Dietas (<i>organic acids concentration in the experimental diets</i>) %	
		21 a 35 Dias (<i>21 to 35 days</i>)	36 a 49 Dias (<i>36 to 49 days</i>)	21 a 35 Dias (<i>21 to 35 days</i>)	36 a 49 Dias (<i>36 to 49 days</i>)
1	-	-	-	0,00	0,00
2	Blend I	1,2	0,9	0,78	0,59
3	Blend II	1,2	0,9	0,84	0,63
4	Blend III	1,5	1,1	0,90	0,66

Após a desmama, os animais foram transportados para a sala de creche de alvenaria, com piso de concreto, forro de madeira rebaixado, janelas de vidro tipo basculante, dotadas de gaiolas metálicas e suspensas, medindo 1,60 x 1,0 x 0,56 m, com piso em plástico expandido e com as laterais de tela metálica, dotada de comedouros semi-automáticos e bebedouros tipo chupeta e lâmpadas de calor (250 W) dispostas à altura dos animais, para promover o aquecimento dos leitões.

Durante o período experimental, um termômetro de máxima e mínima foi colocado em uma gaiola vazia no centro da sala à altura dos animais, para monitoramento do ambiente. As temperaturas foram registradas diariamente às oito horas da manhã. Não foram realizadas a desinfecção e limpeza diária da sala, sendo a limpeza efetuada somente por meio de varrição, com a finalidade de aumentar o desafio.

Para avaliação do desempenho foram utilizadas as variáveis: consumo de ração médio diário (CRMD), ganho de peso médio diário (GPMD) e conversão alimentar (CA). Para mensuração desses parâmetros foram realizadas pesagens dos animais e comedouros no início do experimento e no final de cada período (35 e 49º dias). Os controles do consumo e do desperdício das rações foram feitos diariamente. A conversão alimentar foi calculada pela relação do consumo com o ganho.

Os animais foram observados diariamente, para avaliação da consistência das fezes, utilizando o escore: 1 – fezes duras e firmes; 2 – fezes de consistência normal; 3 – fezes pastosas não diarréicas; e 4 – fezes aquosas, características de quadro diarréico. O escore fecal dos animais está ilustrado na Figura 1.

Foi realizado exame bacteriológico, por meio do isolamento de bactérias das fezes dos animais, para identificar os possíveis microrganismos presentes no ambiente. Coletaram-se as fezes de todas as gaiolas em um único dia, ressaltando-se que havia gaiolas do período de 21 a 35 e de 36 a 49 dias. As amostras foram acondicionadas em saco plástico por tratamento, realizando-se um “pool” de amostras, que foram enviadas ao Laboratório Microvet, em Viçosa, MG, onde foi realizado o exame.



Escore 1



Escore 2



Escore 3



Escore 4

Figura 1 – Escore fecal de leitões alimentados com dietas com diferentes concentrações de ácidos orgânicos, nos períodos de 21 a 35 e 36 a 49 dias de idade.

Figure 1 – Piglets diarrhea score supplemented with different concentrations of organic acids in diets, in the 21 to 35 and 36 to 49 day periods.

Após a pesagem, no 35º dia os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas, e no 36º dia, às sete horas da manhã, foi coletado o sangue de um animal por gaiola (aquele que teve peso mais próximo da média da repetição), totalizando oito amostras por tratamento, para a dosagem de ácido láctico no plasma. O sangue foi acondicionado e identificado em tubos contendo anticoagulante fluoretado (2 gotas de fluoreto). Em seguida, este foi centrifugado e refrigerado, para permanecer estável em até seis dias, e então, enviado para o Laboratório Hermes Pardini, em Belo Horizonte, MG, para posteriores análises.

O plasma foi analisado pelo método enzimático. O aparelho utilizado para a dosagem de lactato foi o Advia 1650 (BAYER), ajustado para o comprimento de onda de 546 nm, caminho óptico 1 cm, e temperatura entre 20 e 37 °C, pela utilização do “kit” Lactato (BIOSYS). Foram preparadas duas misturas para cada tratamento e cada repetição para calibração do equipamento e cálculo da dosagem do ácido láctico: uma

com 20 µl de solução-padrão e 2.000 µl de reagente e a outra com 20 µl de amostra e 2.000 µl de reagente. Após cinco minutos de incubação, foi medida a absorbância das amostras e da solução-padrão. O cálculo da concentração de lactato em mg/dl está apresentado a seguir:

$$\text{Lactato (mg/dl)} = \frac{\Delta E \text{ Amostra}}{\Delta E \text{ Padrão}} \times 30 \text{ (Padrão)}$$

O reagente utilizado foi composto de Tris pH 7,5; 2,4,6 tribromo-3-ácido hidróxibenzóico; lactato oxidase; peroxidase; e p-Aminoantipirina. A enzima lactato oxidase catalisa a reação de lactato para piruvato e dá origem a um cromógeno, que é proporcional à concentração de lactato.

Os animais receberam alimentação à vontade durante três horas e meia de alimentação após a coleta de sangue e, em seguida, foram abatidos. Amostras de digesta foram coletadas no estômago, no duodeno (a 20 cm da inserção do estômago), na porção média do jejuno e no íleo (4% da porção final do intestino delgado), para realizar a dosagem do ácido láctico. As amostras foram acondicionadas e identificadas, submetidas a nitrogênio líquido no momento da coleta e mantidas congeladas em “freezer” a -20 °C, para posterior análise.

O pH da digesta no estômago foi determinado, por meio da utilização de Papel Indicador Especial, com faixa de pH 2,5-4,5 (MERCK), o que foi realizado na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. O papel indicador requer o simples contato da amostra com a tira, indicando o pH do conteúdo pela alteração da coloração da tira.

As análises do ácido láctico foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, utilizando-se o processo de cromatografia gasosa. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente para serem preparadas, usando-se a acetona 99,9% (grau HPLC) como solvente. Foi extraído um grama de cada amostra, pesada em balança analítica e devidamente identificada e, em seguida, adicionada de 2 mL de acetona, permanecendo em repouso por 90 minutos, mas com agitação de um minuto a cada intervalo de 30 minutos. O extrato obtido foi transferido para tubos de Ependorf e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante recolhido em “vials” e armazenado em refrigeração até a análise. As amostras então preparadas foram injetadas no cromatógrafo, coluna DB-Wax 30 m comp. x 0,25 mm D.I x 0,25 micron de filme, com o gás de arraste

hidrogênio 4,7 FID, com vazão de 1,5 mL/min (fluxo constante). A temperatura do forno inicialmente foi de 100 °C durante quatro minutos (com uma rampa de aquecimento de 15 °C/min) de 185 °C durante quatro minutos e de 230 °C durante um minuto. Após esse processamento, a temperatura do forno permaneceu em 235 °C por cinco minutos, para limpeza da coluna.

Os dados de desempenho, de escore fecal e de concentração de ácido láctico no sangue e no trato digestivo foram submetidos à análise de variância, com o uso do programa de análise estatística Statistical Analysis System (SAS), utilizando-se o peso inicial dos animais como co-variável; as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. O modelo estatístico adotado para as análises foi:

$$Y_{ijk} = \mathbf{m} + T_i + B_j + \beta_1 (P_{ijk} - \bar{P}) + \beta_2 (P_{ijk} - \bar{P})^2 + \mathbf{e}_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = observação das características estudadas relativas ao tratamento i no bloco j ;

\mathbf{m} = média geral;

T_i = efeito do tratamento;

B_j = efeito do bloco;

P_{ijk} = efeito do peso inicial;

β_1 e β_2 = coeficientes de regressão linear e quadrático da variável Y_{ijk} , em função do peso inicial dos leitões; e

\mathbf{e}_{ijk} = efeito dos fatores não controlados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As temperaturas máxima e mínima, medidas durante os períodos de 21 a 35 e 36 a 49 dias de idade, são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Temperatura ambiente (°C) dos períodos de 21 a 35 e 36 a 49 dias de idade
Table 4 – Environment temperature (°C) in the 21 to 35 days and 36 to 49 days periods

	Temperatura (<i>Temperature</i>)	
	Período de 21 a 35 Dias (<i>21 to 35 day period</i>)	Período de 36 a 49 Dias (<i>36 to 49 day period</i>)
Mínima (<i>minimum</i>)	22 ± 1,07	21 ± 1,97
Máxima (<i>Maxim</i>)	26 ± 1,19	25 ± 1,07

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha ou na mesma coluna indicam, estatisticamente, diferença significativa pelo teste de Duncan (P<0,05). *Mean values followed by different letters in the same line or in the same column are statistically different by Duncan (P<0,05).*

A temperatura ambiente é o componente climático de maior influência na produção animal (CURTIS, 1983). Assim, o ambiente térmico no qual o suíno é mantido pode influenciar seu consumo de alimento, a taxa, a eficiência e a composição do ganho e, conseqüentemente, o crescimento de leitões (ORLANDO et al., 2001).

Os resultados de consumo de ração médio diário (CRMD), ganho de peso médio diário (GPMD) e conversão alimentar (CA) dos leitões nas fases de 21 a 35, 36 a 49 e 21 a 49 dias de idade, bem como o peso corporal, encontram-se na Tabela 5.

O CRMD e o GPMD não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos, nos três períodos avaliados. Entretanto, no período de 21 a 35 dias os leitões que receberam os tratamentos com 0,78 e 0,84% de ácidos orgânicos na dieta apresentaram GPMD 13,53 e 14,49% maior, em valor absoluto, em relação ao grupo controle, respectivamente.

Os tratamentos influenciaram ($P<0,05$) a conversão alimentar (CA) dos leitões no período de 21 a 35 dias. A CA dos animais que receberam a dieta com 0,84% de ácidos orgânicos foi melhor ($P<0,05$) que a daqueles que consumiram as dietas controle e com 0,90% de ácido e não diferiu ($P>0,05$) da conversão alimentar daqueles que receberam a dieta 0,78%. Isso evidencia o desafio a que os animais foram expostos, pois, mesmo com a inclusão do óxido de zinco em todas as dietas experimentais, o tratamento com 0,84% de ácidos orgânicos se mostrou mais eficiente, devido à ação antimicrobiana.

Não se observou efeito ($P>0,05$) dos tratamentos sobre nenhum dos parâmetros de desempenho avaliados nos períodos de 36 a 49 e de 21 a 49 dias. No entanto, os animais que receberam 0,84 e 0,63% de ácidos orgânicos na dieta apresentaram aumento no GPMD de 5,56% e melhora da CA de 6,29%, no período de 21 a 49 dias.

Vários pesquisadores (GIESTING; EASTER, 1985; PALENZUELA, 2000; SILVA, 2004), avaliando a utilização de ácidos orgânicos em dietas para leitões, têm verificado efeito significativo dos tratamentos com ácido em relação ao grupo-controle sobre a conversão alimentar, sem observar efeito sobre o ganho de peso. No entanto, Silva et al. (2002) observaram melhora no ganho de peso médio diário dos leitões ao suplementarem a dieta com 2,5% de ácido láctico, sem diferenças de consumo de ração e conversão alimentar, em comparação com o controle. Também avaliando ácidos orgânicos nas rações de leitões, Risley et al. (1991), Teixeira et al. (2003) e Corassa (2004) não verificaram variação no consumo de ração dos animais. Já Cole et al. (1968) e Tsiloyiannis et al. (2001a, b), fornecendo ácido láctico na dieta de leitões, observaram que estes apresentaram melhora no ganho de peso, do consumo de ração e da conversão alimentar em relação aos animais do tratamento-controle, demonstrando que o ácido orgânico exerce efeito positivo sobre o organismo do animal como tratamento preventivo de doenças da fase pós-desmame.

Tabela 5 – Peso corporal inicial e final, consumo de ração médio diário (CRMD), ganho de peso médio diário (GPMD) e conversão alimentar (CA) dos leitões alimentados com dietas com diferentes concentrações de ácidos orgânicos, nos períodos de 21 a 35, 36 a 49 e 21 a 49 dias

Table 5 – Initial and final body weight, Average daily feed intake (ADFI), Average daily weight gain (ADWG) e feed conversion rate (FCR) of piglets supplemented with different concentrations of organic acids in diets, in the 21 to 35, 36 to 49 and 21 to 49 day periods

	Tratamentos (<i>Treatments</i>)				CV (%)	Signif.
	Controle (<i>Control</i>)	0,78%	0,84%	0,90%		
Peso inicial	5,63	6,05	6,08	5,78		
Peso final	14,04	15,01	15,17	14,36		
Período de 21 a 35 dias (<i>21 to 35 day period</i>)						
GPMD (ADWG) g	207	235	237	199	13,63	0,1106
CRMD (ADFI) g	273	288	263	274	15,48	0,5942
CA (FCR) g:g	1,30 b	1,23 ab	1,11 a	1,38 b	11,15	0,0285
	Controle (<i>Control</i>)	0,59 %	0,63 %	0,66 %		
Período de 36 a 49 dias (<i>36 to 49 day period</i>)						
GPMD (ADWG) g	408	408	414	424	10,90	0,7176
CRMD (ADFI) g	704	688	695	724	10,58	0,61037
CA (FCR) g:g	1,72	1,69	1,68	1,71	7,24	0,9776
	Controle (<i>Control</i>)	0,78 e 0,59%	0,84 e 0,63%	0,90 e 0,66%		
Período de 21 a 49 dias (<i>21 to 49 day period</i>)						
GPMD (ADWG) g	306	320	323	314	10,10	0,8459
CRMD (ADFI) g	489	488	479	499	10,01	0,6382
CA (FCR) g:g	1,59	1,53	1,49	1,59	7,26	0,6560

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha indicam, estatisticamente, diferença significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Mean values followed by different letters in the same line are statistically different by Dunca, ($P < 0,05$).

Os resultados contraditórios dos trabalhos provavelmente ocorreram devido a fatores como a qualidade da ração fornecida aos animais. A dieta basal formulada aos animais para todo o período experimental foi composta de lactose, carboidrato utilizado pela microflora presente no trato digestivo, resultando na síntese do ácido láctico pelo processo fermentativo. Por isso, caso a dieta não fosse suplementada com lactose, o efeito do fornecimento de ácidos orgânicos seria mais pronunciado.

O valor do pH do estômago de leitões alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ácidos orgânicos no período de 21 a 35 dias de idade é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – pH do estômago de leitões alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ácidos orgânicos, no período de 21 a 35 dias de idade

Table 6 – Piglets stomach pH supplemented with differents concentrations of organic acids in diets, in the 21 to 35 day peroids

Tratamentos (<i>Treatments</i>)	pH do Estômago (<i>Stomach pH</i>)
Controle (<i>Control</i>)	3,73
0,78%	3,79
0,84%	3,60
0,90%	3,61
Signif.	0,5801
CV (%)	12,89

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o pH do estômago, resultado similar ao obtido por Silva (2004), que, trabalhando com ácido láctico e outros ácidos orgânicos, também não observou queda de pH no estômago dos leitões que receberam as dietas com os ácidos orgânicos. Entretanto, os resultados deste trabalho diferem dos apresentados por Thomlinson e Lawrence (1981), que observaram diminuição do pH gástrico de leitões que receberam dietas com a adição de 0,8% de ácido láctico, em comparação com a dieta-controle.

É importante salientar que, como o pH é uma função logarítmica, mudanças aparentemente pequenas de pH, na realidade, correspondem a variações grandes da

concentração de H⁺. Assim, quando o pH varia de 0,3 unidade, a concentração de H⁺ torna-se duas vezes maior; contudo, se varia de 3,0, a concentração torna-se mil vezes maior (VIEIRA et al., 1995). Alterações do pH têm várias implicações fisiológicas no organismo do animal, comprometendo a atividade celular ao influenciarem as funções metabólicas essenciais (HALM et al., 2004), a síntese de DNA e RNA e a multiplicação celular (SILVA, 2004).

Os dados de escore fecal dos leitões alimentados com as dietas experimentais, nos períodos de 21 a 35, 36 a 49 e de 21 a 49 dias de idade, são apresentados na Tabela 7 e na Figura 2.

Tabela 7 – Escore fecal de leitões alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ácidos orgânicos, nos períodos de 21 a 35, 36 a 49 e 21 a 49 dias de idade

Table 7 – Piglets diarrhea score supplemented with differents concentrations of organic acids in diets, in the 21 to 35, 36 to 49 and 21 to 49 day peroids

Períodos (<i>peroids</i>)	Tratamentos (<i>Treatments</i>)				CV (%)	Signif
	Controle (<i>Control</i>)	0,78%	0,84%	0,90%		
21 a 35 dias (<i>21 to 35 day</i>)	2,7 ab	2,7 ab	2,6 a	2,9 b	6,96	0,0086
	Controle (<i>Control</i>)	0,59%	0,63%	0,66%		
36 a 49 dias (<i>36 to 49 day</i>)	2,5 b	2,3 ab	2,2 a	2,5 b	8,03	0,01469
	Controle (<i>Control</i>)	0,78 e 0,59%	0,84 e 0,63%	0,90 e 0,66%		
21 a 49 dias (<i>21 to 49 day</i>)	2,6 ab	2,5 ab	2,4 a	2,7 b	6,67	0,0052

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha indicam, estatisticamente, diferença significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). *Mean values followed by different letters in the same line are statistically different by Duncan ($P < 0,05$).*

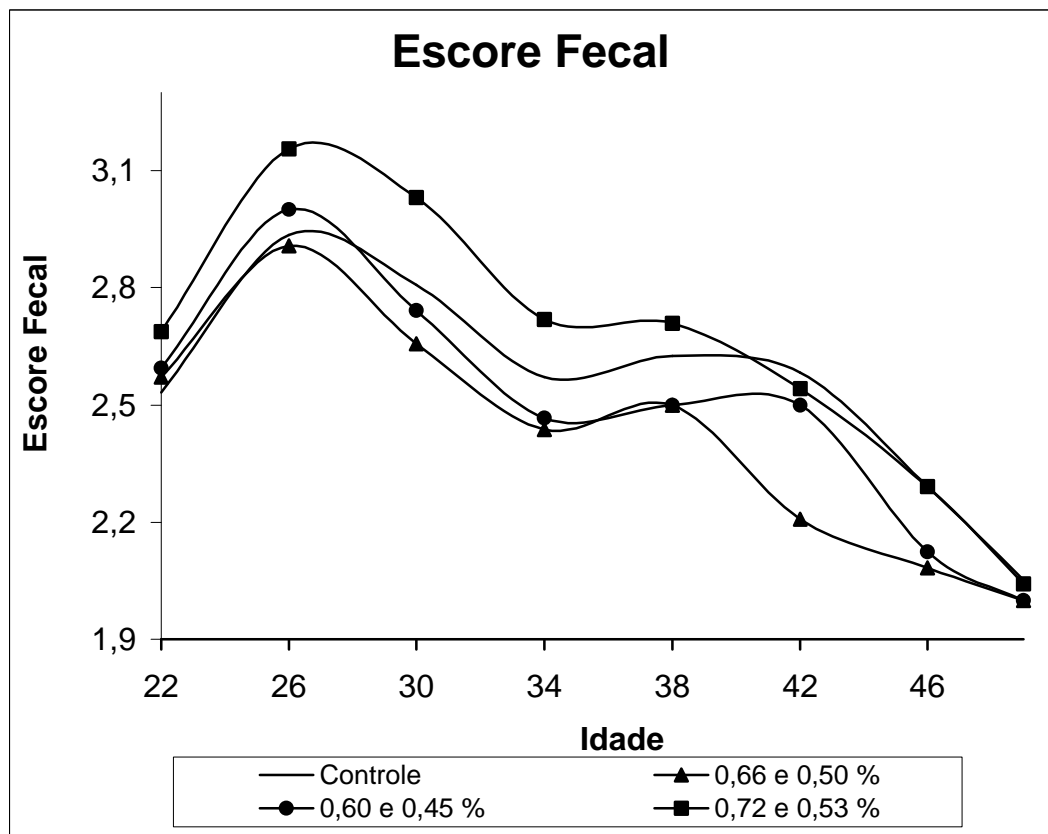


Figura 2 – Escore fecal de leitões alimentados com dietas com diferentes concentrações de ácidos orgânicos, nos períodos de 21 a 49 dias de idade.

Figure 2 – Piglets diarrhea score supplemented with different concentrations of organic acids in diets, in the 21 to 49 day periods.

Observou-se efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos sobre o escore fecal nos três períodos experimentais, com os leitões que receberam a ração com 0,84% de ácidos orgânicos apresentando menor escore fecal em relação aos que receberam 0,90%. Esse resultado corrobora os obtidos por Tsioloyiannis et al. (2001b), que, utilizando 1,6% de ácido láctico na dieta de leitões no período de 28 dias após o desmame, também observaram menor valor de escore fecal nos animais que receberam ácido na ração aos do tratamento-controle. No entanto, os resultados deste estudo diferiram dos verificados por Silva (2004), que não constatou variação no escore fecal em leitões alimentados com acidificantes em relação ao controle.

Em todos os tratamentos, os leitões apresentaram diarreia nos primeiros dias após a chegada à creche, devido ao estresse nutricional que sofreram. A recuperação dos

leitões foi gradual, porém o tratamento com 0,84% de ácido láctico, no período de 21 a 35 dias, exigiu menor tempo para a melhora dos animais.

O aumento do trânsito intestinal, além de ser agressivo para a mucosa, comprometendo a absorção e, conseqüentemente, o desempenho animal, remove quantidades massivas de bactérias colonizadoras (BONGAERTS et al., 2005), favorecendo a colonização de patógenos.

Os valores das concentrações médias de ácido láctico no trato digestivo e no sangue dos leitões aos 35 dias de idade são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Concentração de ácido láctico (AL) nas porções do trato digestivo e no sangue de leitões aos 35 dias de idade

Table 8 – Digestive tract and blood lactic acid concentration (LA) in piglets at 35 days old

	Tratamentos (<i>Treatments</i>)				CV (%)	Signif.
	Controle (<i>Control</i>)	0,78%	0,84%	0,90%		
AL estômago (<i>stomach LA</i>) mg/dl	53	107	111	118	52,41	0,5467
AL duodeno (<i>duodenumLA</i>) mg/dl	56	75	75	33	42,49	0,1448
AL jejuno (<i>jejun LA</i>) mg/dl	65	73	76	71	42,78	0,3477
AL íleo (<i>ileum LA</i>) mg/dl	26	24	50	55	68,93	0,2880
AL sangue (<i>blood LA</i>) mg/dl	33 a	47 ab	45 ab	53 b	34,78	0,0338

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha ou na mesma coluna indicam, estatisticamente, diferença significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). *Mean values followed by different letters in the same line or in the same column are statistically different by Duncan ($P < 0,05$).*

Os tratamentos não influenciaram ($P > 0,05$) a concentração de ácido láctico no trato digestivo. No entanto, foi possível observar valores numéricos muito distintos entre os tratamentos com ácido e o tratamento controle. A região do trato digestivo dos animais com maior concentração de ácido láctico foi o estômago. Em todos os tratamentos, a concentração de ácido láctico foi reduzindo à medida que a digesta avançava no lúmen intestinal, sendo menor a concentração no íleo, exceto no tratamento

com 0,90% de ácidos orgânicos, que teve menor concentração de ácido no duodeno. A razão desse fato não tem explicação biológica aparente.

A concentração de ácido láctico no sangue dos animais que receberam as dietas com ácido orgânico não variou ($P>0,05$). Entretanto, a concentração de ácido láctico no sangue dos animais que receberam as dietas com 0,78 e 0,84% não diferiu ($P>0,05$) do tratamento-controle, mas a daqueles que receberam 0,90% de ácido sim ($P<0,05$), aumentando em 60,61% a concentração de ácido láctico em relação ao grupo-controle. Esse excesso de ácidos orgânicos na dieta dos animais que consumiram 0,90% de ácido foi provavelmente o fator que piorou o escore fecal dos leitões.

As bactérias encontradas nas fezes dos animais, identificadas através do exame bacteriológico, são representadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Exame bacteriológico das fezes de leitões alimentados com as diferentes dietas experimentais, nos períodos de 21 a 35 e 36 a 49 dias

Table 9 – Bacteriological examinations of piglets feces supplemented with different experimental diets in the 21 to 35 and 36 to 49 day periods

Tratamentos (<i>Treatments</i>)		Agente Isolado (<i>Isolated agent</i>)		
Períodos (<i>Periods</i>)		<i>E. coli</i> b -hemólise (<i>E. coli</i> b -haemolytic)	<i>E. coli</i> a -hemólise (<i>E. coli</i> a -haemolytic)	<i>Streptococcus</i> sp.
21 a 35 dias (21 to 35 day)	36 a 49 dias (36 to 49 day)			
Controle (<i>Control</i>)	Controle (<i>Control</i>)	+	+	+
0,78%	0,59%	+	+	+
0,84%	0,63%	+	-	-
0,90%	0,66%	+	-	+

Convenções adotadas: presença (+) e ausência (-). *Adopt conventions: presence (+) and absence (-).*

O tratamento controle retratou o desafio a que os animais foram submetidos. Entre as bactérias encontradas estava a *E. coli* **b**-hemólise, isolada das fezes de todos os tratamentos, o que coincidiu com o histórico da granja de doença do edema, diagnosticada por meio de sinais clínicos típicos e necropsia dos leitões. Silva (2004), trabalhando com ácido láctico e outros ácidos orgânicos, também observou a presença de *E. coli*, ao contrário de Tsiloyiannis et al. (2001b), que verificaram redução no número de *E. coli* -hemolítica positiva nas fezes dos animais que receberam ácidos

orgânicos no período de 28 dias após o desmame. A *E. coli* K88⁺ β-hemolítica pode diminuir a taxa de crescimento dos animais e, possivelmente, aumentar a mortalidade devido à doença do edema e à diarreia pós-desmame (PLUSKE et al., 1997; TSILOYIANNIS et al., 2001a).

Entre os tratamentos avaliados, o que correspondeu à inclusão de níveis de ácidos orgânicos de 0,84 e 0,63%, respectivamente, nas fases de 21 a 35 e 36 a 49 dias de idade, foi o mais eficiente, considerando-se que não foram isoladas das fezes dos leitões as bactérias *E. coli* α-hemólise e *Streptococcus* sp.

CONCLUSÃO

A utilização de ácidos orgânicos na alimentação animal proporciona melhor conversão alimentar com a suplementação de 0,84% de ácidos no período de 21 a 35 dias e melhor consistência de fezes e controle de *E. coli* α -hemólise e *Streptococcus* sp. com a suplementação de 0,84 e 0,63% de ácidos, no período de 21 a 49 dias.

REFERÊNCIAS

BLOMBERG, L. et al. Piglet ileal mucus contains protein and glycolipid (galactosylceramide) receptors specific for *Escherichia coli* K88 fimbriae. **Infection And Immunity**, v.61, Issue 6, p.2526-2531, 1993.

BLUMENSTOCK, E.; JANN, K. Adhesion of piliated *Escherichia coli* strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pilli and those with mannose-resistant pilli. **Infection and Immunity**, v.35, n.1, p.264-269, 1982.

BONGAERTS, G.; SEVERIJNEN, R.; TIMMERMAN, H. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. **Medical Hypotheses**, v.64, Issue 1, p. 64-68, 2005.

BURNELL, T.W.; GROMWELL, G.L.; STAHLY, T.S. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.66, n. 5-6, p.1100, 1988.

CANIBE, N. et al. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2123-2133, 2001.

CANTAROW; SCHEPARTZ. **Biochemistry**. 4. ed. Phyladelphia & London: W. B. Saunders Company, 1967. 848 p.

CASEY, G.D. et al. Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract P.G. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, Issue 5, p.431-438, 2004.

COLE, D.J.A.; BEAL, R.M.; LUSCOMBE, J.R. The effect on performance and bacterial flora of lactic acid, propionic acid, calcium propionate and calcium acrylate in the drinking water of weaned pigs. **Veterinary Record**, v.83, n.14, p.459-464, 1968.

CORASSA, A. **Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos, probióticos e níveis de ácido fólico em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade.** Viçosa, MG: UFV, 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COTTER, P.D.; GAHAN, C.G.; HILL, C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. **Molecular Microbiology**, v.40, p.465-475, 2001.

CURTIS, S.E. **Environmental managment in animal agriculture.** 2. ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 1983. 410 p.

DAVIS, B.D. et al. **Microbiology** 2. ed. [S. l.]: Harper & Row Publisher, Inc., 1973. 1562 p.

DEAN, J.A.; LANGE, N.A. **Lange's hand book of chemistry.** 13. ed. [S. l.]: McGraw Hill, 1985. 1424 p.

ENGLISH, P.R.; SMITH, W.J.; MACLEAN, A. **The sow: improving her efficiency.** 3. ed. Ipswich, UK: Fanning Press, 1979. 311 p.

EWASCHUK, J.B. et al. Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers. **Journal of Chromatograph B**, v.781, Issues 1-2, p.39-56, 2002.

FERES, F. A. **Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em dietas para frangos de corte.** Viçosa, MG: UFV, 2003. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FRANKLIN, M.A. et al. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.2904-2910, 2002.

GAUTHIER, R. Avanços atuais em suinocultura. **Pork Word**, v. 3, n. 15, p. 98-102, 2003.

GIESTING, D.W.; EASTER, R.A. Response of starter pigs to supplemetation of corn-soybean meal diets with organic acids. **Journal of Animal Science**, v. 60, n.5, p.1288-1294, 1985.

GRAVESEN, A. et al. Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by d- and l-lactic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, Issue 6, p.528-532, 2004.

GREKO, C. Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters. In: **Gut environment of pigs.** Nottingham: Nottingham University Press, 2001. p.219-230.

HALM, M. et al. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, Issue 1, p.97-103, 2004.

HERSH, B.M. et al. A glutamate dependent acid resistance gene in *E. coli*. **Journal of Bacteriology**, v.27, p.3978-3981, 1996.

HINTON, M.; LINTON, A.H.; PERRY, F.G. Control of salmonella by acid disinfection of chicks food. **Veterinary Record**, v.116, n.1 (suppl.7), p.502, 1985.

HOLYOAK, C.D. et al. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.9, p.3158-3164, 1996.

HUNTER, D.R.; SEGEL, I.H. Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence of a proton or charge gradient as the driving force. **Journal of Bacteriology**, v.113, p.1184-192, 1973.

JENKINS, D.J.; KENDALL, C.W.; VUKSAN, V. Inulin, oligofructose and intestinal function. **Journal of Nutrition**, v.129, Issue 7, p.1431s-1433s, 1999.

JENSEN, B.B. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. **Journal of Animal Feed Science**, v.7, p.45-64, 1998.

KNARREBORG, A. et al. A. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.99, Issues 1-4, p.131-140, 2002.

KUANA, S. Pontos críticos de controle de *Salmonella* em fábricas de ração. In: SOARES MATTOS, W.R. et al. (Eds.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 2001. p.927.

LIN, J. et al. Variable effects of short chain fatty acids and lactic acid in inducing intestinal mucosal injury in newborn rats. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v.35, n.4, p.545-550, 2002.

LISA, J. Lactic acid outlook up as poly lactide nears market. **Chemistry Market Report**, v.259, n.9, p. 5-6, 2001.

LIU, S.Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n.2, p.115-131, 2003.

MANNERS, M.J. The development of gastric function in the pig. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.35, p.49-55, 1976.

MATHEW, A.G.; FRANKLIN, M.A.; UPCHURCH, W.G. Effect of weaning on ileal short-chain Fatty acids concentrations in pigs. **Nutrition Research**, v.16, p.1698, 1996.

MC WILLIAM LEITCH, E.C.; STEWART, C.S. *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to l-lactate than to d-lactate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4676-4678, 2002.

NAVEENA, B.J. et al. Direct fermentation of starch to (+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. **Process Biochemistry**, v.40, Issue 2, p.681-690, 2005.

ORLANDO, U.A.D. et al. Níveis de proteína bruta para leitões dos 30 aos 60 kg mantidos em ambiente de alta temperatura (31 °C). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1536-1543, 2001a.

PALENZUELA, P.R. Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. In: **XI Curso de especialización**. [S. l.]: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal – FEDNA, 2000. p.171-181.

PARTANEN, K.H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v.12, n.1, p.117-145, 1999.

PEDROSO, A.A. **Efeito de probióticos dietético sobre o desempenho, qualidade de ovos e alguns aspectos morfológicos do trato intestinal e tecido ósseo de galinhas poedeiras**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 65 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K.E.; LINDBERG, J.E. **Gut environment of pigs**. 1. ed. The Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press, 2001. p.260.

PLUSKE, J.R.; WILLIAMS, I.H.; AHME, F.X. Nutrition of the neonatal pig. In: VARLEY, M.A. (Ed.). **The neonatal pig: development and survival**. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 1995. p. 187-235, 1995.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, p.215-236, 1997.

PRESSER, K.A.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.6, p.2355-2360, 1977.

RISLEY, C.R. et al. Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weaning pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.35, n.3-4, p.259-270, 1991.

RISLEY, C.R. et al. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. **Journal of Animal Science**, v.70, p.196-206, 1992.

ROOLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZI, B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 153-156, 2004.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos; tabelas brasileiras**. Viçosa, MG, 2000. 141 p.

ROTH, F.X. Ácidos orgánicos en nutrición porcina: eficacia y modo de acción. In: **XVI Curso de especialización**: [S. l.]: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal – FEDNA, 2000. p.169-181.

SANDERS, J.W. et al. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. **Molecular Microbiology**, v.27, p.299-310, 1998.

SANTOS, M.S. et al. Avaliação da suplementação de mananoligossacarídeos e acidificantes em dietas para suínos fêmeas na fase de terminação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2003. **Anais...** Goiânia, GO: ABRAVES, 2003. p.307-308.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE (SAS). **User's guide**: statistics cary. [S. l.]: NC; SAS Institute Inc., 1999.

SCIPIONI, R.; ZAGHINI, G.; BIAVATI, A. Researches on the use of acidified diets for early weaning of piglets. **Zootecnica e Nutricione Animale**, v.4, p.201-218, 1978.

SILVA, A.S. et al. *Escherichia coli* strains from edema disease: o serogroups, and genes for Shiga toxin, enterotoxins, and F18. **Veterinary Microbiology**, v. 80, Issue 3, p.227-233, 2001.

SILVA, M.C. et al. Efeito da adição de acidificantes e suas combinações na alimentação de leitões desmamados sobre o desempenho. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife, PE: SBZ, 2002. (05.sbz.993.pdf. 2002). CD-ROM.

SILVA, G.F. **Digestibilidade ileal de aminoácidos de soja micronizada e de farelo de soja para suínos e avaliação de acidificantes em dietas para leitões**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TEIXEIRA, M.P. et al. Avaliação de ácidos orgânicos e inorgânicos em dietas para leitões desmamados aos 21 dias de idade. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 40., 2003, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: SBZ, 2003.

THOMLINSON, J.R.; LAWRENCE, T.L.J. Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: some field observations. **Veterinary Record**, v.109, n.1, p.120-122, 1981.

TSILOYIANNIS, V.K. et al. The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.281-285, 2001a.

TSILOYIANNIS, V.K. et al. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.287-293, 2001b.

TZIPORI, S. et al. *Escherichia coli* and rotavirus infections in four-week-old gnotobiotic piglets fed milk or dry food. **Australian Veterinary Journal**, v.56, n.1, p.279-284, 1980.

UENO, Y. et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO a12005. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.61, n.7, p.1168-1171, 1997.

VIEIRA, E.C. et al. **Química fisiológica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 414 p.

VINCINT, J.G.; VEOMATT, R.C.; RILEY, R.F. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Bacteriology**, v.78, n.4, p.477, 1959.

WOODCOCK, N.P. et al. J. An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients. **Clinical Nutrition**, v.23, Issue 5, p.1069-1073, 2003.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.38, Issue 1, p.73-75, 2005.

APÊNDICE

Tabela 1A – Análise de variância do consumo de ração médio diário, ganho de peso médio diário, conversão alimentar e escore fecal, no período de 21 a 35 dias de idade

Variável	GL	SQ	QM	F	
CRMD					
Tratamento	3	0,00348632	0,00116211	0,64	0,5942
Bloco	1	0,00359868	0,00359868	1,99	0,1703
Peso inicial linear	1	0,02074943	0,02074943	11,49	0,0023**
Peso inicial quadrático	1	0,02066826	0,02066826	11,45	0,0024**
Resíduo	25	0,04513784	0,00180551		
Total	31	0,07611700			
GPMD					
Tratamento	3	0,00595568	0,00198523	2,22	0,1106
Bloco	1	0,00009024	0,00009024	0,10	0,7533
Peso inicial linear	1	0,00294761	0,00294761	3,30	0,0814
Peso inicial quadrático	1	0,00273507	0,00273507	3,06	0,0925
Resíduo	25	0,02234232	0,00089369		
Total	31	0,03619547			
CA					
Tratamento	3	0,20961486	0,06987162	3,56	0,0285*
Bloco	1	0,06435917	0,06435917	3,28	0,0822
Peso inicial linear	1	0,17113215	0,17113215	8,72	0,0068**
Peso inicial quadrático	1	0,18016339	0,18016339	9,18	0,0056**
Resíduo	25	0,49069929	0,01962797		
Total	31	1,02237292			
Escore fecal					
Tratamento	3	0,53714745	0,17904915	4,84	0,0086**
Bloco	1	0,31313081	0,31313081	8,47	0,0075**
Peso inicial linear	1	0,00000005	0,00000005	0,00	0,9991
Peso inicial quadrático	1	0,00388017	0,00388017	0,10	0,7487
Resíduo	25	0,92464917	0,03698597		
Total	31	1,56334275			

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

Tabela 2A – Análise de variância do pH e da concentração de ácido láctico no estômago, no período de 21 a 35 dias de idade

Variável	GL	SQ	QM	F	
pH do Estômago					
Tratamento	3	0,45082633	0,15027544	0,67	0,5801
Bloco	1	0,67361919	0,67361919	2,99	0,0961
Peso inicial linear	1	0,19578369	0,19578369	0,87	0,3601
Peso inicial quadrático	1	0,28678609	0,28678609	1,27	0,2699
Resíduo	25	5,63106966	0,22524279		
Total	31	6,76846369			
AL estômago					
Tratamento	3	0,59840365	0,19946788	0,73	0,5467
Bloco	1	0,07140775	0,07140775	0,26	0,6152
Peso inicial linear	1	0,13016194	0,13016194	0,48	0,4987
Peso inicial quadrático	1	0,16890762	0,16890762	0,62	0,4419
Resíduo	16	4,34631690	0,27164481		
Total	22	6,18511348			

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

Tabela 3A – Análise de variância da concentração de ácido láctico no duodeno, jejuno, íleo e sangue, no período de 21 a 35 dias de idade

Variável	GL	SQ	QM	F	
AL duodeno					
Tratamento	3	0,41602402	0,13867467	2,14	0,1448
Bloco	1	0,08125970	0,08125970	1,25	0,2834
Peso inicial linear	1	0,03117511	0,03117511	0,48	0,5004
Peso inicial quadrático	1	0,05883988	0,05883988	0,91	0,3583
Resíduo	13	0,84353564	0,06488736		
Total	19	1,69599740			
AL jejuno					
Tratamento	3	0,15084314	0,05028105	0,81	0,5082
Bloco	1	0,09467206	0,09467206	1,53	0,2374
Peso inicial linear	1	0,23101811	0,23101811	3,74	0,0751
Peso inicial quadrático	1	0,29147257	0,29147257	4,72	0,0488*
Resíduo	13	0,80212740	0,06170211		
Total	19	1,36492956			
AL íleo					
Tratamento	3	0,30486879	0,10162293	1,39	0,2880
Bloco	1	0,11630560	0,11630560	1,59	0,2284
Peso inicial linear	1	0,01690189	0,01690189	0,23	0,6385
Peso inicial quadrático	1	0,02832659	0,02832659	0,39	0,5442
Resíduo	14	1,02620853	0,07330061		
Total	20	1,54387391			
AL sangue					
Tratamento	3	2425,138380	808,379460	3,39	0,0338*
Bloco	1	1089,246202	1089,246202	4,56	0,0427*
Peso inicial linear	1	301,305051	301,305051	1,26	0,2720
Peso inicial quadrático	1	382,318468	382,318468	1,60	0,2174
Resíduo	25	5969,785690	238,791428		
Total	31	9695,454490			

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

Tabela 4A – Análise de variância do consumo de ração médio diário, ganho de peso médio diário, conversão alimentar e escore fecal, no período de 36 a 49 dias de idade

Variável	GL	SQ	QM	F	
CRMD					
Tratamento	3	0,01024828	0,00341609	0,62	0,6103
Bloco	1	0,02973048	0,02973048	5,37	0,0289*
Peso inicial linear	1	0,07795474	0,07795474	14,08	0,0009**
Peso inicial quadrático	1	0,07740566	0,07740566	13,99	0,0010**
Resíduo	25	0,13837233	0,00553489		
Total	31	0,35615524			
GPMD					
Tratamento	3	0,00275509	0,00091836	0,45	0,7176
Bloco	1	0,00149880	0,00149880	0,74	0,3982
Peso inicial linear	1	0,01123724	0,01123724	5,54	0,0268*
Peso inicial quadrático	1	0,01030900	0,01030900	5,08	0,0332*
Resíduo	25	0,05070834	0,00202833		
Total	31	0,09056146			
CA					
Tratamento	3	0,00298502	0,00099501	0,07	0,9776
Bloco	1	0,05842004	0,05842004	3,86	0,0607
Peso inicial linear	1	0,04812595	0,04812595	3,18	0,0868
Peso inicial quadrático	1	0,05474101	0,05474101	3,62	0,0688
Resíduo	25	0,37853489	0,01514140		
Total	31	0,50475440			
Escore fecal					
Tratamento	3	0,46485546	0,15495182	4,26	0,0146*
Bloco	1	0,15346096	0,15346096	4,22	0,0505
Peso inicial linear	1	0,01813792	0,01813792	0,50	0,4865
Peso inicial quadrático	1	0,00656506	0,00656506	0,18	0,6745
Resíduo	25	0,90893899	0,03635756		
Total	31	1,43165076			

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

Tabela 5A – Análise de variância do consumo de ração médio diário, ganho de peso médio diário, conversão alimentar e escore fecal, no período de 21 a 49 dias de idade

Variável	GL	SQ	QM	F	
CMD					
Tratamento	3	0,00411241	0,00137080	0,57	0,6382
Bloco	1	0,01350410	0,01350410	5,64	0,0255*
Peso inicial linear	1	0,04478522	0,04478522	18,71	0,0002**
Peso inicial quadrático	1	0,04451748	0,04451748	18,60	0,0002**
Resíduo	25	0,05982730	0,00239309		
Total	31	0,15771413			
GMD					
Tratamento	3	0,00082639	0,00027546	0,27	0,8459
Bloco	1	0,00026307	0,00026307	0,26	0,6156
Peso inicial linear	1	0,00487763	0,00487763	4,79	0,0381*
Peso inicial quadrático	1	0,00435971	0,00435971	4,28	0,0490*
Resíduo	25	0,02544341	0,00101774		
Total	31	0,04247569			
CA					
Tratamento	3	0,02062049	0,00687350	0,55	0,6560
Bloco	1	0,08463968	0,08463968	6,71	0,0157*
Peso inicial linear	1	0,11987895	0,11987895	9,51	0,0049**
Peso inicial quadrático	1	0,13096329	0,13096329	10,39	0,0035**
Resíduo	25	0,31521233			
Total	31	0,58341970			
Escore fecal					
Tratamento	3	0,47763017	0,15921006	5,43	0,0052**
Bloco	1	0,22625332	0,22625332	7,71	0,0103*
Peso inicial linear	1	0,00454992	0,00454992	0,16	0,6971
Peso inicial quadrático	1	0,00008774	0,00008774	0,00	0,9568
Resíduo	25	0,73359956	0,02934398		
Total	31	1,26157836			

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.