

Raquel Silva de Moura

Probióticos ou fitase na dieta de potros
Mangalarga Marchador

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Profa. Dr. Adalgiza Souza Carneiro de Rezende

Co-Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2010

M929p Moura, Raquel Silva de, 1982-
Probiótico ou fitase na dieta de potros Mangalarga Marchador / Raquel Silva de
Moura. – 2010.
94 p. : il.

Orientadora: Adalgiza Souza Carneiro de Rezende
Co-orientador: Jacques Robert Nicoli
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Mangalarga (Cavalo) – Alimentação e rações – Teses. 2. Suplemento alimentar – Teses. 3.
Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 4. Dieta em veterinária – Teses.
5. Probióticos – Teses. 6. Levedos – Teses. I. Rezende, Adalgiza Souza Carneiro de. II.
Nicoli, Jacques Robert. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

CDD – 636.108 5


BANCA EXAMINADORA

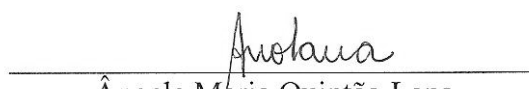
Tese defendida e aprovada pela comissão constituída por:


Adalgiza Souza Carneiro de Rezende
(Orientadora)


José Augusto de Freitas Lima


Fernando Queiroz de Almeida


Marília Martins Melo


Ângela Maria Quintão Lana

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
27 de outubro de 2010

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial aos meus pais, irmãs, cunhado e sobrinho, que juntos suportaram comigo essa jornada.

EPIÍGRAFE

Em cada ano, um aprendizado:

“Uns confiam em carros, outros em cavalos; nós, porém, nos gloriamos em o nome do SENHOR, nosso Deus.” (Sl. 20:7)

“Não sabes, não ouviste que o eterno Deus, o SENHOR, o criador dos fins da terra, nem se cansa, nem se fatiga? Não se pode esquadrihar o seu entendimento. Faz forte ao cansado e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor. Os jovens se cansam e se fatigam, e os moços de exaustos caem, mas os que esperam no SENHOR renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.” (Is. 40: 28-31)

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam ao SENHOR, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.” (Rm 8:28)

“Ora, àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós, a ELE seja a glória, na Igreja e em CRISTO JESUS, por todas as gerações, para todo o sempre. Amém!” (Ef. 3:20-21)

"Nenhum esforço se perde."
Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Nominar todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão dessa etapa da minha vida é difícil, pois finalizo um período de 11 anos de experiências e aprendizados vivenciados durante minha formação acadêmica na Universidade Federal de Minas Gerais.

A Deus, minha família e todas as pessoas que pertencem ou já passaram pela Escola de Veterinária da UFMG (em especial a Profa. Adalgiza Rezende e Profa. Eloísa Saliba) e pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (em especial ao Prof. Jaques Nicoli, Flávio Barbosa, Leandro Bambirra e Tássia Souza).

A FAPEMIG, CNPq, Haras Catuni, Lesaffre Feed Additives (Saf Agri do Brasil), Total Alimentos S./A., Laboratório Vitafort Ind. e Com. de Prod. Veterinários Ltda, Basf, Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas Ltda (IPEVE) e Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

Aos membros das bancas examinadoras para qualificação no curso de doutorado (Prof. Walter Motta, Prof. Jacques Nicoli e Prof. Geraldo Eleno - UFMG) e para defesa da tese (Profa. Adalgiza Rezende, Profa. Ângela Lana, Profa. Marília Martins - UFMG, Prof. José Augusto Lima – UFLA e Prof. Fernando Queiroz - UFRRJ). Muito obrigada pela compreensão e apoio.

Aos equídeos (em especial aos potros Catuni Uaitã, Catuni Ubatã, Catuni Udick, Catuni Uirapurú, Catuni Uivo, Catuni Ultimatum, Catuni Umã, Catuni Umbú, Catuni Universo, Catuni Uracá, Catuni Urandí, Catuni Urânio, Catuni Urikan, Catuni Urso, Catuni Urutau e Catuni Usak), razão da minha admiração, dedicação e empenho na busca pelo conhecimento técnico-científico.

SUMÁRIO	Página
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	
1.1. DESENVOLVIMENTO CORPORAL DE POTROS MANGALARGA MARCHADOR.....	18
1.2. ADITIVOS NUTRICIONAIS USADOS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	21
1.2.1. Probióticos.....	21
1.2.1.1. Microbiota digestiva equina.....	21
1.2.1.2. Utilização de probióticos na espécie equina.....	25
1.2.2. Fitase exógena.....	27
1.2.2.1. Fundamentos para utilização da fitase exógena.....	27
1.2.2.2. Utilização de fitase exógena na espécie equina.....	31
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO CORPORAL DE POTROS MANGALARGA MARCHADOR ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM PROBIÓTICOS OU FITASE EXÓGENA	
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	32
2.1 INTRODUÇÃO.....	33
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.3.1 Peso vivo, medidas corporais e índices de conformação dos potros desmamados Mangalarga Marchador.....	39
2.3.2 Parâmetros sanguíneos dos potros desmamados Mangalarga Marchador.....	52
2.3.3 Índice cortical dos potros desmamados Mangalarga Marchador.....	59
2.4 CONCLUSÕES.....	61
CAPÍTULO III - VIABILIDADE E ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE MICROORGANISMOS PRESENTES EM FÓRMULAS PROBIÓTICAS COMERCIAIS USADAS EM EQUINOS	
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	62
3.1 INTRODUÇÃO.....	63
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.3.1 Teste de viabilidade.....	66
3.3.2 Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	71
3.4 CONCLUSÕES.....	72

CAPÍTULO IV - ESTABILIDADE ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE UMA FITASE EXÓGENA USADA NA DIETA DE EQUINOS	
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	73
4.1 INTRODUÇÃO.....	74
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.4 CONCLUSÕES.....	78
<hr/>	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
<hr/>	
5. ANEXOS.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABELAS	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Percentual de peso vivo e altura na cernelha esperado nos potros Mangalarga Marchador, em relação aos adultos.....	18
Tabela 2. Relação entre idade e percentual do peso vivo adulto de potros Mangalarga Marchador.....	19
Tabela 3. Concentrações microbianas das diferentes partes do trato digestivo de equinos alimentados com dietas ricas em fibras ou amido.....	23
Tabela 4. Principais características das fitases de origem microbiana, vegetal ou animal.....	29
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Composição química de matéria seca (MS), energia digestível (ED), proteína bruta (PB), lisina, extrato etéreo (EE) e oxalato dos alimentos fornecidos aos animais.....	34
Tabela 2. Composição química de carboidratos da dieta fornecida aos animais.....	35
Tabela 3. Composição química de minerais dos alimentos fornecidos aos animais (base MS).....	35
Tabela 4. Composição química do sal mineral fornecido aos animais do experimento (base MS).....	36
Tabela 5. Médias, desvios-padrão e percentuais de peso vivo, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	40
Tabela 6. Médias do escore corporal de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	41
Tabela 7. Médias, desvios-padrão e percentuais de altura na cernelha, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	44
Tabela 8. Médias, desvios-padrão e percentuais de altura na garupa, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	45
Tabela 9. Médias, desvios-padrão e percentuais de comprimento corporal, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	46
Tabela 10. Médias, desvios-padrão de altura no costado de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase....	47
Tabela 11. Médias, desvios-padrão e percentuais de perímetro torácico, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	48
Tabela 12. Médias, desvios-padrão e percentuais de perímetro de canela, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	49

Tabela 13. Concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	52
Tabela 14. Quantidade diária de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) consumidos através do concentrado e sal mineral fornecidos aos potros.....	54
Tabela 15. Proteínas séricas totais, albumina e globulinas (frações α -1, α -2, β -1, β -2 e γ) de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada com ou sem probióticos ou fitase.....	58
Tabela 16. Valores médios dos ganhos mensais de índice cortical do terceiro metacarpiano direito de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	60

CAPÍTULO III

Tabela 1. Níveis de garantia de duas fórmulas probióticas comerciais utilizadas em equinos.....	64
Tabela 2. Presença de halo de inibição de crescimento de patógenos por microorganismos isolados de probióticos comerciais.....	71

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de fitase exógena comercial.....	76
Tabela 2. Concentração de fósforo (P) fítico liberado em solução péptica e sob efeito de diferentes dosagens de fitase exógena e variações de pH.....	77
Tabela 3. Concentração de fósforo (P) fítico liberado em diferentes dosagens de fitase exógena e submetidos a quatro tempos de digestão pancreática.....	77

ANEXOS

Tabela 1. Precipitações pluviométricas do ano de 2006 na Fazenda Santa Helena, Montes Claros-MG.....	80
Tabela 2. Consumo diário de sal mineral dos potros durante o experimento.....	81
Tabela 3. Ganho médio diário de peso vivo dos animais utilizados no experimento (em kg/dia).....	82
Tabela 4. Ganho médio mensal de altura na cernelha dos animais utilizados no experimento (em cm/mês).....	82
Tabela 5. Ganho médio mensal de altura na garupa dos animais utilizados no experimento (em cm/mês).....	83
Tabela 6. Ganho médio mensal de comprimento corporal dos animais utilizados no experimento (em cm/mês).....	83
Tabela 7. Ganho médio mensal de altura de costado dos animais utilizados no experimento (em cm/mês).....	84
Tabela 8. Ganho médio mensal de perímetro torácico dos animais utilizados no experimento (em cm/mês).....	84
Tabela 9. Ganho médio mensal de perímetro de canela dos animais utilizados no experimento (em cm/mês).....	85
Tabela 10. Valores de referência para concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio em equinos, segundo diversos autores.....	86

LISTA DE FIGURAS	Página
CAPÍTULO II	
Figura 1. Fracionamento eletroforético das proteínas séricas equinas em acetato de celulose, tampão veronal pH 8,6 (leitura no software para densitometria por scanner).....	37
Figura 2. Ganho diário de peso vivo, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	40
Figura 3. Ganho mensal de altura na cernelha, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	44
Figura 4. Ganho mensal de altura na garupa, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	45
Figura 5. Ganho mensal de comprimento corporal, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	46
Figura 6. Ganho mensal de altura no costado, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	47
Figura 7. Ganho mensal de perímetro torácico, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	48
Figura 8. Ganho mensal de perímetro de canela, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	49
Figura 9. Índice corporal, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase....	50
Figura 10. Índice dáctilo-torácico, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	51
Figura 11. Índice de carga de canela, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	52
Figura 12. Concentração sérica de fósforo (mg/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	53
Figura 13. Concentração sérica de magnésio (mg/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	54
Figura 14. Concentração sérica de fosfatase alcalina (UI/L), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	56

Figura 15. Concentração sérica de uréia (mg/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	57
Figura 16. Concentração sérica de alfa-1-globulinas (g/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	58
Figura 17. Índice cortical do terceiro metacarpiano direito (%), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase.....	59

CAPÍTULO III

Figura 1. Concentração de leveduras vivas (<i>S. cerevisiae</i> Sc47) presente no <i>probiótico 1</i> estocado em duas diferentes temperaturas.....	66
Figura 2. Viabilidade de bactérias produtoras de ácido láctico (<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>) presentes no <i>probiótico 2</i> em pasta (2a) e em pó (2b), armazenado em duas diferentes temperaturas.....	69
Figura 3. Viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> presente no <i>probiótico 2</i> em pasta (3a) e em pó (3b), armazenado em duas diferentes temperaturas.....	70

CAPÍTULO IV

Figura 1. Percentual de fósforo fitico liberado sob ação da enzima fitase em diferentes faixas de pH.....	76
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%.....	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mL.....	Mililitros
g.....	Gramas
kg.....	Quilogramas
kg/dia.....	Quilogramas por dia
mm.....	Milímetros
cm.....	Centímetros
cm/dia.....	Centímetros por dia
cm/mês.....	Centímetros por mês
PV.....	Peso vivo
GDPV.....	Ganho diário de peso vivo
GAC.....	Ganho mensal de altura na cernelha
GAG.....	Ganho mensal de altura na garupa
GCC.....	Ganho mensal de comprimento corporal
GACo.....	Ganho mensal de altura no costado
GPT.....	Ganho mensal de perímetro torácico
GPC.....	Ganho mensal de perímetro de canela
IC.....	Índice corporal
IDT.....	Índice dáctilo-torácico
ICC.....	Índice de carga de canela
Ca.....	Cálcio
P.....	Fósforo
Mg.....	Magnésio
FA.....	Fosfatase alcalina
α -1-globulinas..	Alfa um globulinas
α -2-globulinas..	Alfa dois globulinas
β -1-globulinas.	Beta um globulinas
β -2-globulinas.	Beta dois globulinas
γ -globulinas.....	Gama globulinas
mg/dL.....	Miligramas por decilitro
g/dL.....	Gramas por decilitro
UI/L.....	Unidades internacionais por litro
μ L.....	Microlitros
ufc.....	Unidades formadoras de colônias
ufc/mL.....	Unidades formadoras de colônias por mililitros

\log_{10} ufc/g.....	Logaritmo decimal de unidades formadoras de colônias por grama
FTU.....	Unidade de atividade de fitase
FTU/kg.....	Unidade de atividade de fitase por quilogramas
rpm.....	Rotações por minuto
% p./v.	Porcentagem de peso por volume
M.....	Massa molar
N.....	Concentração normal
nm.....	Nanometros

RESUMO

No **experimento 1** avaliou-se os efeitos da suplementação com probióticos ou fitase sobre o desenvolvimento corporal de 16 potros Mangalarga Marchador, dos 173±8 dias (desmame) aos 363±12 dias de idade, distribuídos em quatro grupos experimentais: **A**-dieta (pastagem de *Cynodon*+1,2kg/100kg PV de concentrado+água e sal mineral *ad libitum*); **B**-dieta+5g/dia de 10⁹ ufc/g *S. cerevisiae*; **C**-dieta+2g/dia de 10⁸ ufc/g *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* e 10⁵ ufc/g *S. cerevisiae*; e **D**- dieta+544 FTU/kg concentrado/dia de fitase. O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo de parcelas subdivididas, sendo os resultados de ganhos de peso vivo, medidas corporais, índices de conformação, parâmetros sanguíneos e índice cortical do metacarpo direito comparados pelo teste SNK e por equações de regressão. Os aditivos testados não afetaram as variáveis avaliadas ($P>0,05$), exceto ganho mensal de índice cortical que foi maior no grupo **B** aos 273 dias ($P<0,05$). O probiótico composto por *S. cerevisiae* influenciou positivamente na mineralização óssea de potros aos 100 dias pós desmame. No **experimento 2** objetivou-se avaliar a viabilidade de microorganismos presentes em probióticos comerciais, um composto por *S. cerevisiae* Sc47 (pó liofilizado – *probiótico 1*) e outro por *S. cerevisiae*, *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* (pasta ou pó por *spray drying* – *probiótico 2*), armazenados em diferentes temperaturas (4°C ou ambiente); e produção *in vitro* de substâncias antagonistas contra *Salmonella* spp. e *E.coli*. Os resultados foram analisados por estatística descritiva e equações de regressão. Houve diferenças na viabilidade de acordo com o modo de conservação, sendo a apresentação em pó, sem (*probiótico 1*) ou com resfriamento (*probiótico 2*), mais adequado para manutenção de células viáveis por 12 meses após fabricação. O *probiótico 2* em pasta deve ter seu prazo de validade reduzido e ser armazenado a 4°C. As bactérias avaliadas produziram substâncias antagonistas *in vitro*, sendo necessários estudos *in vivo* para futura aplicação em equinos. No **experimento 3** estudou-se a estabilidade enzimática *in vitro* de fitase exógena comercial em diferentes pH e em condições *in vitro* de digestão péptica e pancreática equina. Os resultados foram analisados por teste de Tukey e equações de regressão. A fitase manteve sua atividade catalítica em pH 2,3 a 7,0 e sob ataque de enzimas presentes no estômago e intestino delgado equino.

Palavras-chave: aditivos, bactérias produtoras de ácido láctico, crescimento, enzimas, equinos, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

In **experiment 1**, was assess the effects of probiotic or phytase supplementation on body development of 16 Mangalarga Marchador colts, of 173±8 days (weaning) to 363±12 days of age, and allocated into four treatments groups: **A**-diet (*Cynodon* pasture + 1.2 kg/100 kg BW of concentrate + water and mineral salt *ad libitum*); **B**-diet+5 g/day of yeast culture (10⁹ CFU/g *S. cerevisiae*); **C**-diet+2g/day of bacteria (10⁸ CFU/g *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*) and yeast culture (10⁵ CFU/g *S. cerevisiae*); and **D**-diet + 544 FTU/kg concentrate/day of phytase. All foals were randomized, by replicated, using a split-plot arrangement, and results of body weight gains, body measurements, conformation index, blood parameters, means and gains of cortical index of the right third metacarpus were compared using SNK test ($P<0,05$) and regression equations ($P<0,10$). The additives tested did not affect the variables evaluated ($P>0,05$), except cortical index gains that was higher in B group at 273 days. The probiotic composed of *S. cerevisiae* had a positive influence on bone mineralization of foals at 100 days after weaning. In **experiment 2**, was assess the viability of microorganisms in commercial probiotics used in horses, one composed of *S. cerevisiae* Sc47 (lyophilized powder – *probiotic 1*) and another of *S. cerevisiae*, *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* (paste or powder by spray drying – *probiotic 2*), and stored at two different temperatures (4° C or room temperature); and to assess the *in vitro* production of antagonistic substances against *Salmonella* spp. e *E.coli*. The results were evaluated by descriptive statistics and regression equations. There were differences in the viability of microorganisms according to the method of preservation, being the powder presentation (lyophilized or by drying spray), without (*probiotic 1*) or with (*probiotic 2*) cooling, the most appropriate for maintaining viable microorganisms for 12 months after manufacturing. The *probiotic 2* in paste should has reduced the validity and be stored at 4°C. The lactic acid producing bacteria produces antagonistic substances that inhibit the growth of pathogens that cause diarrhea in horses, being necessary *in vivo* studies to future use on horses. In **experiment 3**, was study the *in vitro* enzymatic stability of an commercial exogenous phytase on different pH ranges (2.3, 2.6, 2.9, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0) and on equine peptic and pancreatic digestion. The results were compared using Tukey test ($P<0,05$) and regression equations. The commercial exogenous phytase retained the enzymatic activity on *in vitro* conditions of pH variation and the attack of enzymes present in the stomach and small intestine of horses.

Keywords: additives, enzymes, growth, horses, lactic acid-producing bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUÇÃO GERAL

O rebanho equino brasileiro é o quarto maior do mundo e as atuais pesquisas na espécie estão relacionadas às perspectivas dos segmentos do *complexo do agronegócio cavalo* no país (Almeida e Silva, 2010). Nutrição e alimentação são uma das principais áreas estudadas, tendo em vista sua importância produtiva e econômica para adequado desempenho zootécnico e saúde animal.

A utilização de aditivos na nutrição animal vem crescendo nos últimos anos, mas ainda faltam trabalhos científicos que comprovem todos os benefícios esperados para equinos (Nutrients..., 2007), especialmente quando criados nas condições brasileiras. O Brasil é um país tropical onde os períodos de chuva são bem definidos e a grande extensão territorial das propriedades permitem a adoção de sistema produtivo diferenciado daquele preconizado nos países de clima temperado (Carvalho e Haddad, 1987). Em diversos criatórios, os equinos permanecem soltos durante todo ano, sendo o pasto seu único alimento e que perde seu valor nutricional durante o período de seca.

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Guidelines..., 2002). Na espécie equina, esses aditivos são utilizados visando melhorias no aproveitamento da dieta, desenvolvimento corporal, condicionamento físico e prevenção e/ou recuperação de doenças, embora haja poucos trabalhos que comprovem seus possíveis efeitos benéficos para a espécie. Especificamente na produção animal, existem diversos trabalhos que comprovaram a melhoria da digestibilidade dos nutrientes com a utilização de probióticos na dieta de equinos, especialmente sobre a fração fibrosa da dieta (Furtado et al., 2010; Jouany et al., 2009; Moura et al., 2010, 2009; Hill e Gutsell, 1998; Moore et al., 1994; Kim et al., 1991), mas são necessários estudos para avaliação dos efeitos indiretos desse benefício nutricional sobre o desenvolvimento corporal de potros criados nas condições brasileiras.

A fitase exógena é um aditivo enzimático de interesse na nutrição de monogástricos, em virtude dos efeitos deletérios que os fitatos provocam na mineralização desses animais. Poucos trabalhos foram desenvolvidos para avaliação da suplementação com essa enzima na dieta de equinos (Dunnett et al., 2009; Moura et al., 2009, 2010; Hainzea et al., 2004; Van Doorn et al., 2004; Patterson et al., 2002), especialmente em potros, uma categoria muito exigente em minerais.

Diante da necessidade de pesquisas sobre a utilização desses dois aditivos como possíveis estratégias alimentares para melhoria do desempenho zootécnico de potros, foi realizado este trabalho de tese que teve como objetivos: avaliar os efeitos da suplementação com probióticos ou fitase exógena sobre o desenvolvimento corporal de potros desmamados Mangalarga Marchador criados em condições semi-extensivas (experimento 1 – capítulo II); avaliar o efeito do modo de conservação sobre a viabilidade de microrganismos probióticos presentes em fórmulas comerciais, bem como a produção de substâncias antagonistas *in vitro* destes microrganismos contra agentes causadores de diarreia em equinos (experimento 2 – capítulo III); estudar a estabilidade enzimática *in vitro* de uma fitase exógena usada na dieta de equinos (experimento 3 – capítulo IV).

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. DESENVOLVIMENTO CORPORAL DE POTROS MANGALARGA MARCHADOR

O Mangalarga Marchador é a principal raça nacional criada no Brasil, com mais de 369.965 animais registrados, destacando-se pela rusticidade, docilidade e comodidade de seu andamento (Lima et al., 2006). As principais características morfológicas do equino adulto dessa raça são: animais eumétricos e mediolíneos; altura na cernelha entre 140 - 154 cm (ideal 146 cm) e 147 - 157 cm (ideal 152 cm) para fêmeas e machos, respectivamente; cabeça triangular com perfil reto a subcôncavo; pescoço piramidal; estrutura forte e bem proporcionada; andamento tipo marcha batida ou picada. Eles são selecionados para participação em exposições especializadas, concursos de marcha, enduros, lida com gado, cavalgadas, provas funcionais e lazer em geral (Uma raça..., 2010).

Casiuch (1997), citado por Costa et al. (2005), explicou que as linhagens (principais núcleos de criação) da raça Mangalarga Marchador estão divididas em dois grupos, chamados de linhagens antigas e linhagens de tradição. As linhagens antigas tiveram origem nos criatórios onde se iniciou o trabalho de seleção a partir do século XIX, sendo elas: Favacho, Traituba, Narciso, Campo Lindo, Tropa 53, Angaí, Engenho da Serra, Leme, Juca Carneiro, Criminosos, Silvestre-Goiabal e Água Limpa (as cinco últimas estão extintas). As linhagens de tradição foram aquelas que tiveram sua origem em animais oriundos das linhagens antigas, sendo submetidas à seleção artificial para fixação do andamento, docilidade, conformação e caracterização racial. Estas fornecem reprodutores para novas criações, destacando-se: Ara, Bela Cruz, Catuni, Garças, Caxambu, Gironda, Herdade, Itamotinga, Porto, Abaíba (que engloba as linhas Providência ou AJ, Sama, Cachoeirinha, Pau D'Alho, Santo Antônio, Rima e Santana), Aliança, Passa Tempo, Calciolândia, Tabatinga e km 47, do Instituto de Zootecnia. Algumas dessas linhagens de tradição que influenciaram na formação da raça estão praticamente extintas e atualmente os animais oriundos das linhagens antigas, como Favacho, Traituba, Campo Lindo, tropa 53 e Angaí, estão sendo muito valorizados, o que pode ser constatado nos leilões e julgamentos das exposições especializadas realizadas no país.

Na tabela 1 está representado o percentual de peso vivo e altura na cernelha esperado em potros Mangalarga Marchador, em relação ao adulto, onde pode ser observado o rápido desenvolvimento corporal no primeiro ano de vida desses animais, semelhante às demais raças equinas de sela (Nutrients..., 2007; Cabral et al., 2004b; Rezende et al., 1986).

Tabela 1. Percentual de peso vivo e altura na cernelha esperado nos potros Mangalarga Marchador, em relação aos adultos

Raça	Peso vivo (% adulto)			Altura cernelha (% adulto)		
	Nascimento	6 meses	12 meses	Nascimento	6 meses	12 meses
Mangalarga Marchador	9,7	33,4	62,0 (macho) 71,0 (fêmea)	61,6 (macho) 63,2 (fêmea)	81,0 (macho) 82,8 (fêmea)	88,0 (macho) 90,0 (fêmea)

Fonte: Adaptado do Nutrients... (2007), Cabral et al. (2004a) e Rezende et al. (1986).

A exigência nutricional diária de potros é influenciada pela taxa de crescimento do animal, a qual varia entre as raças, porém a carência de trabalhos sobre o desenvolvimento da curva específica de crescimento para diversas raças equinas não permite essa diferenciação nos requisitos disponíveis nos guias nutricionais (Nutrients..., 2007). Existem diversas publicações sobre o crescimento de animais da raça Puro Sangue Inglês (Jelan et al., 1996; Pagan et al., 1996), porém ainda são poucos os

trabalhos com outras raças equinas, especialmente as brasileiras (Pinto et al., 2005a,b; Santos et al., 2005; Cabral et al., 2004a,b,c; Rezende et al., 2000a,b).

A altura máxima dos equinos adultos é determinada geneticamente, mas o desenvolvimento corporal (tamanho e taxa de crescimento) de animais jovens pode ser influenciado pelo sexo, mês de nascimento, condições climáticas, nutrição e manejo (Vasconcelos et al., 2010; Heusner, 1992; Saastamoinen, 1990a). Vários fatores interferem no crescimento pré-natal dos animais, tais como: tamanho materno, número de partos da égua, tamanho da placenta, nutrição da matriz e estresse climático; sendo o tamanho materno o mais importante dentre estes (Jainudee e Hafez, 1982, citados por Pinto et al., 2005b).

O desenvolvimento de equinos jovens, geralmente, é avaliado pelo peso e medidas corporais, como altura na cernelha, altura na garupa, comprimento do corpo, comprimento da cabeça, perímetro torácico e perímetro da canela (Pinto et al., 2005b; Cabral et al., 2004b; Rezende et al., 2000a). Cabral et al. (2004b) afirmaram que a largura da cabeça e as distâncias joelho-boleto e jarrete-boleto, por apresentarem pequena variação do nascimento aos 12 meses de idade, poderiam ser outras medidas lineares mensuradas para avaliação e seleção fenotípica de potros.

A estimativa do peso vivo de potros, a partir dos valores esperados quando adultos, é utilizada para se determinar a taxa de crescimento de equinos de diferentes raças com diferentes pesos vivos (Nutrients..., 2007). Na tabela 2 está representada a relação entre idade e percentual de peso vivo adulto de potros da raça Mangalarga Marchador, calculados através de quatro métodos disponíveis na literatura (Nutrients..., 2007; Santos et al., 2005; Rezende et al., 1986; Nutrients..., 1989).

Tabela 2. Relação entre idade e percentual do peso vivo adulto de potros Mangalarga Marchador

Idade (dias)	Rezende et al. (1986) ¹	Nutrients... (1989)	Santos et al. (2005) ²	Nutrients... (2007) ³
% Peso vivo adulto				
Nascimento	-	-	-	9,7
20	-	-	13,7	14,8
40	-	-	16,9	18,5
60	-	-	20,2	22,6
80	-	-	24,4	26,4
100	-	-	27,8	30,1
120	-	36,3	31,2	33,6
140	-	-	34,5	36,9
160	-	-	38,5	40,1
180	33,4	45,0	-	43,2
270	51,3	-	-	54,9
360	64,2	66,3	-	64,2

¹Média dos pesos estimados para potros Mangalarga Marchador através das seguintes equações:

Peso macho (kg) = [400 - 449,2142*(e^{-0,0028*X})]; onde X = idade em dias.

Peso fêmea (kg) = [350 - 486,9200*(e^{-0,0042*X})]; onde X = idade em dias.

²Porcentagem do peso vivo das mães (415-440 kg).

³Y = 9,7 + (100-9,7)*(1-(e^(-0,0772 * X))) (R²=0,99); onde: Y= % do peso adulto e X = idade em meses.

Cabral et al. (2004a,b,c) avaliaram o crescimento de potros Mangalarga Marchador do nascimento até 12 meses de idade, através de medidas lineares, medidas angulares, índices de conformação e proporções corporais. As medidas lineares dos animais não foram influenciadas por sexo, número de animais no rebanho, região de origem, manejo nutricional, mês e ano de nascimento, sendo observado percentual de altura na cernelha, no nascimento, aos seis meses e aos 12 meses de vida, em relação à idade

adulta (151,5 cm), de 61,6%, 81,0% e 88,0% para machos e de 63,2%, 82,2% e 90% para fêmeas, respectivamente (Cabral et al., 2004b). Com relação às medidas angulares, Cabral et al. (2004a) observaram que os valores das angulações corporais variaram em função do crescimento, mas de forma não linear durante o período estudado, com valores de 79,6 a 93,5° para o ângulo escápulo-umeral e de 69,9 a 86,7° para o ângulo coxo-femural.

O Sistema Eclético de Proporções Lineares preconizado por Lesbre (1920) e citado por Ribeiro (1993) padronizou internacionalmente as proporções corporais esperadas para equinos adultos destinados às atividades de sela, utilizando o comprimento da cabeça como referência (distância entre a extremidade proximal da cabeça, que coincide com a crista da nuca, e a parte medial ou central da arcada incisiva inferior). Cabral et al. (2004c) utilizaram essa metodologia, juntamente com o cálculo de alguns índices de conformação citados por Oom e Ferreira (1987), para estudo das proporções corporais de potros Mangalarga Marchador do nascimento aos 12 meses de idade. Esses autores observaram que os potros nasceram com altura na cernelha e na garupa maiores e comprimento corporal menor que o preconizado pelo Sistema de Lesbre, mas essas proporções tendem a se aproximarem do esperado quando adulto à medida que os animais crescem. Os animais ao nascimento foram classificados como brevilíneos (índice corporal de 81,36 para machos e 82,33 para fêmeas), porém aos quatro meses de idade já apresentaram conformação mediolínea (índice corporal de 88,76 para machos e 88,24 para fêmeas) semelhante aquela observada nos adultos e esperada em animais destinados para sela. Quanto ao índice dáctilo-torácico, que indica relação entre a massa do animal e os membros que a suportam, os potros no nascimento até os 12 meses de idade foram classificados como hipermétricos (valores acima de 11,5), enquanto os animais adultos apresentaram conformação eumétrica. O índice de carga de canela, que indica a capacidade das extremidades de um animal deslocar sua massa (valores baixos significam membros fracos), apresentou rápido decréscimo do nascimento (25,93 nos machos e 26,18 nas fêmeas) ao terceiro mês de vida (11,5 para machos e fêmeas), em função do rápido ganho de peso em contraposição à pequena variação do perímetro de canela. Esse índice nos adultos foi de 4,16 nos machos e 4,96 nas fêmeas.

Pinto et al. (2005a) avaliaram as medidas morfométricas de potros Mangalarga Marchador utilizando análise multivariada de componentes principais, concluindo que as medidas corporais que mais contribuem para explicação da variância total observada em animais (machos e fêmeas) recém-nascidos foram comprimento do casco anterior, altura na garupa, largura do peito e comprimento do pescoço; aos seis meses de idade foram a distância do jarrete ao boleto, a distância do codilho ao joelho e o perímetro do antebraço e aos 12 meses de idade foi o perímetro do antebraço. Ao realizar análise discriminante para definição de equações que identifiquem potros Mangalarga Marchador sub ou superdesenvolvidos, do nascimento aos doze meses de idade, e para melhor caracterização fenotípica dos animais quanto ao sexo, Pinto et al. (2005b) observaram que as medidas lineares permitem maiores percentuais de acerto na classificação de animais recém-nascidos e aos seis e 12 meses de idade, quando comparadas com medidas angulares. Nos animais recém-nascidos, as medidas de perímetro do boleto, comprimento do corpo, comprimento da cabeça, altura na cernelha, distância da soldra ao jarrete e perímetro do joelho possibilitaram discriminar os potros das potras. Os potros apresentaram valores médios maiores que as potras em todas as seis medidas citadas, concordando com Saastamoinen (1990b). Aos seis meses de idade, os machos foram maiores que as fêmeas para as medidas de perímetro do joelho, perímetro do boleto e comprimento do pescoço e menores no perímetro torácico, em decorrência, provavelmente, da seleção nas fêmeas para maior profundidade do corpo e arqueamento de costelas. As medidas do perímetro do joelho, perímetro torácico, altura na cernelha e altura na garupa foram as que apresentaram poder de discriminar potros de potras aos 12 meses de idade, sendo os potros maiores do que as potras, exceto para perímetro torácico.

Portanto, a avaliação morfológica de equinos em crescimento deve ser realizada minuciosamente, pois a comercialização dos potros ocorre principalmente no primeiro ano de vida e responde por grande parte da receita bruta dos criatórios. Além disso, conhecer o padrão de desenvolvimento dos potros permite a estimativa de parâmetros que possibilitem selecionar com acurácia animais ainda em idade precoce como no desmame (Pinto et al., 2005a).

1.2 ADITIVOS NUTRICIONAIS USADOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

1.2.1 Probióticos

1.2.1.1. Microbiota digestiva equina

Para entender e prever os efeitos de mudanças alimentares, estresse, exercício, idade, doenças ou tratamentos com drogas sobre a microbiota digestiva equina, assim como os possíveis benefícios com a utilização de probióticos em equinos, é necessário um conhecimento básico sobre a composição microbiológica e funções desse complexo ecossistema microbiano que habita o sistema digestório do hospedeiro (De Fombelle et al., 2003; Daly et al., 2001). Infelizmente, o estudo sobre a composição microbiológica da microbiota endógena presente no sistema digestório equino tem recebido pouca atenção nas pesquisas, quando comparado com os estudos sobre as bactérias presentes no rúmen de bovinos ou cólon de humanos e suínos.

Todos os animais, inclusive invertebrados, possuem uma microbiota no tubo digestivo que interage com eles por mutualismo. Os níveis populacionais dos microorganismos endógenos podem exceder 1×10^{10} células viáveis por grama de material seco, sendo subdivididos em três populações: dominante (concentração acima de 10^9 ufc/g do conteúdo), subdominante (concentração entre 10^7 a 10^8 ufc/g do conteúdo) e residual (concentração abaixo de 10^7 ufc/g do conteúdo). Os dois primeiros grupos permanecem relativamente constantes e estáveis no tempo e entre indivíduos, sendo a população residual bastante variável. Coletivamente, a microbiota digestiva pode ser considerada como um “órgão” metabolicamente ativo, no qual os microorganismos dominantes e subdominantes são capazes de gerar metabólitos que interferem com o organismo hospedeiro (Nicoli et al., 2003; Stappenbeck et al., 2002).

A colonização das superfícies e cavidades corporais, incluindo o trato gastrointestinal, ocorre a partir do nascimento, tendo início dentro do canal do parto. Segundo Sakaitani et al. (1999), citados por Yuyama et al. (2004), a colonização em potros neonatos ocorre numa sequência bem definida, aparecendo primeiramente bactérias anaeróbias facultativas, seguidas por bactérias anaeróbias obrigatórias da família Bacteroidaceae (gêneros *Fusobacterium* e *Bacteroides*) e bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido láctico do gênero *Lactobacillus*, as quais passam a predominar na segunda semana de vida. O *Lactobacillus* é o microorganismo endógeno predominante no trato digestivo equino, com 178 cepas isoladas (Morotomi et al., 2002), sendo que as principais espécies que colonizam a região aglandular do estômago são: *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. reuteri* e *L. agilis* (Yuki et al., 2000).

Alexander e Davies (1963) e Kern et al. (1973), ambos citados por Kern et al. (1974), e Kern et al. (1974) foram os primeiros autores a publicarem dados referentes a microbiota digestiva equina. Estes autores observaram presença de 20 vezes mais bactérias viáveis na região fúndica do estômago, em relação à região pilórica, o que evidenciou a ocorrência de fermentação no estômago (inclusive com presença de acetato e outros ácidos graxos voláteis), embora com limitada atividade celulolítica, devido ao baixo pH, baixa concentração de bactérias celulolíticas e rápida taxa de passagem da dieta. De acordo com esses pesquisadores, a atividade proteolítica ocorre em todas as áreas do trato digestivo, principalmente no intestino delgado. Quando avaliaram a produção de ácidos graxos voláteis, houve grande produção de ácido isobutírico no estômago e intestino delgado, o que foi interessante pelo fato desse ácido graxo volátil poder agir como fator de crescimento para a microbiota do trato posterior. O número de bactérias celulolíticas por grama de ingesta foi seis vezes maior no ceco em comparação ao cólon. Porém, ao se considerar o peso da ingesta, seis vezes maior no cólon em relação ao ceco, o potencial de degradação da fibra se torna importante nesses dois compartimentos do aparelho digestivo equino.

Maczulak et al. (1985) avaliaram a população de bactérias cecais totais e encontraram resultados semelhantes aos de Kern et al. (1974). Foram isolados 114 organismos no ceco equino, sendo 50,9% bacilos Gram negativos (*Butyrivibrio*, *Bacteroides* e “Selenomonads”), 22,8% bacilos Gram positivos (*Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*), 21,9% cocos Gram positivos (*Streptococcus*, *Staphylococcus*) e 4,4% cocos Gram negativos. A concentração microbiana variou de 2,37 a $4,72 \times 10^9$ células por mL de conteúdo cecal (microscopia direta) a $3,6 \pm 0,44 \times 10^8$ ufc/mL (crescimento em meio que

simulava o habitat, composto por 40% fluido ruminal com depleção de energia, 0,125% carboidratos totais, peptonas tripticasas, glicerol e hemina).

Lin e Stahl (1995) e Julliand et al. (1999) analisaram a microbiota anaeróbia do intestino grosso equídeo (equinos e asininos), através do sequenciamento RNA ribossomal (rRNA) 16S bacteriano, concluindo que *Fibrobacter* spp. e *Ruminococcus* spp. (especialmente *R. flavefaciens*) são bactérias celulolíticas importantes no ceco, correspondendo por mais de 12% e 9% do rRNA total analisado, respectivamente. No caso do *Ruminococcus flavefaciens*, foram observadas diferenças testadas quanto à utilização dos carboidratos e produtos finais da fermentação entre as cepas equinas e as cepas ruminais, pois aquelas produzem mais acetato, formato e etanol. A concentração de bactérias totais e celulolíticas no ceco de equino foi cerca de 100 vezes menor que a concentração encontrada no rúmen, representando as bactérias celulolíticas 2,3% e 3,8% das bactérias anaeróbicas totais nos jumentos e pôneis, respectivamente.

Daly et al. (2001) estudaram de forma mais ampla a diversidade bacteriana do intestino grosso de equinos em pastejo, extraíndo rRNA de amostras diretamente coletadas no conteúdo luminal e parede celular do ceco e cólon. A maioria das sequências recuperadas neste estudo não correspondeu com nenhuma sequência genômica previamente documentada nos bancos de dados disponíveis, indicando serem novas espécies pertencentes a grupos filogenéticos ainda descaracterizados. Apenas 11% das sequências recuperadas apresentaram mais de 97% de homologia com qualquer entrada documentada, onde apenas 5% corresponderam a espécies conhecidas. Do material conhecido, 72% das sequências foram identificadas como bactérias Gram positivas com baixo conteúdo percentual de guanina+citosina, especialmente do cluster clostridial XIVa (*Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Butyrivibrio* spp. e *Eubacterium* spp.). Essa predominância também foi observada em estudos genômicos realizados em outras espécies animais, como humanos (Wilson e Blitchington, 1996) e bovinos (Tajima et al., 1999), sugerindo que esse grupo possui atividade importante dentro do ecossistema digestivo. Davies (1964), citado por Julliand et al. (1999), observou que a bactéria *Bacillus cellulosa* *dissolvens* também é componente da microbiota cecal equina.

Bonhomme (1986) estudou o mecanismo de adesão das bactérias cecais equinas à parede celular vegetal e observou o mesmo modo de ação das bactérias ruminais. Esses microorganismos possuem um envelope celular que confere proteção e possui enzimas hidrolíticas. Esse revestimento externo, tipo cápsula, permite sua adesão através de fibras polissacarídeas do glicocálix bacteriano para liberação das enzimas por difusão no ambiente.

Protozoários e fungos estão presentes no intestino grosso equino, mas parecem possuir menor importância que as bactérias para fermentação celulolítica. Segundo Brandi e Furtado (2009), os protozoários atingem cerca de 10^{-4} da população microbiana, ou seja, de $0,5$ a 5×10^5 /mL de conteúdo, sendo que foram descritas 72 espécies de protozoários no intestino grosso equino, destacando-se os gêneros: *Buetschilia*, *Cycloposthum*, *Blepharocorys* e *Paraisotricha*.

Segundo Akin (1987), os fungos podem constituir até 8% da biomassa microbiana ruminal de animais alimentados com dietas ricas em fibras e estão envolvidos na degradação da parede celular lignificada. Ankur et al. (2006) avaliaram a presença de fungos anaeróbios provenientes de caprinos e ovinos, identificando fungos de ciclo monocêntrico (zoósporos poliflagelados e filamentos com rizomicélio abundante – gênero *Neocallimastix*) e policêntrico (zoósporos uniflagelados e filamentos com rizomicélio – gêneros *Anaeromyces*, *Orpinomyces* e *Piromyces*). Esse resultado concordou com Abrão et al. (2010), que detectaram presença de estruturas características dos dois tipos de fungos anaeróbios no conteúdo ruminal de bovinos e caprinos de corte criados no Norte de Minas Gerais, os quais eram mantidos em sistemas extensivos. Julliand et al. (1998) compararam as atividades metabólicas de fungos isolados de bovinos e ovinos (*Piromyces communis*) e de equinos e jumentos (*Piromyces citronii*). As cepas equídeas cresceram mais rapidamente que as cepas ruminais na presença de glicose e celobiose, principalmente a cepa isolada de jumentos, sugerindo que os fungos também são importantes para degradação da celulose em equídeos.

De Fombelle et al. (2003) também avaliaram a população microbiana dos diferentes segmentos anatômicos do trato digestivo equino (estômago até cólon menor) e observaram que as concentrações de bactérias anaeróbicas totais variaram de $7,4 \times 10^7$ a $3,7 \times 10^9$ ufc/mL, havendo interação significativa entre dieta e segmento anatômico (tabela 3). As concentrações pré-cecal e cecal de bactérias celulolíticas foi de 3×10^2 ufc/mL e $5,9 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^6$ ufc/mL, respectivamente. Nos equinos alimentados com dieta rica em amido, as concentrações pré-cecais de bactérias celulolíticas foram

ligeiramente maiores que no intestino grosso, entretanto, foram homogêneas ao longo do trato digestivo quando os animais receberam dieta rica em volumosos.

Tabela 3. Concentrações microbianas das diferentes partes do trato digestivo de equinos alimentados com dietas ricas em fibras ou amido

Trato digestivo	Bactérias anaeróbicas totais (Log ₁₀ ufc/mL)		Bactérias celulolíticas (Log ₁₀ ufc/mL)		Lactobacilli (Log ₁₀ ufc/mL)		<i>Streptococcus</i> (Log ₁₀ ufc/mL)		Bactérias que utilizam lactato (Log ₁₀ ufc/mL)	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
Estômago	9,1 ^{d,e}	9,0 ^d	1,4 ^a	1,0 ^a	7,8 ^{b*}	8,4 ^{d*}	7,3 ^b	7,5 ^c	6,8 ^{c*}	7,6 ^{e*}
Jejuno	8,7 ^{c,d}	8,6 ^{c,e}	1,8 ^{a*}	0,9 ^{a*}	6,5 ^a	6,8 ^b	8,1 ^c	7,5 ^{c,d}	6,7 ^{c,b}	6,5 ^c
Íleo	7,9 ^{a,b*}	8,8 ^{d,c*}	1,7 ^a	1,0 ^a	6,4 ^{a*}	7,2 ^{b,c*}	7,4 ^{b,c*}	8,0 ^{d*}	6,5 ^{b,c,d*}	7,2 ^{d*}
Ceco	7,6 ^a	7,7 ^a	6,0 ^{b*}	5,0 ^{b,c*}	6,2 ^a	6,1 ^a	6,2 ^a	6,3 ^a	6,1 ^{a,d*}	5,6 ^{a*}
Cólon ventral direito	8,1 ^{b*}	8,9 ^{d,c*}	6,0 ^b	5,5 ^c	6,5 ^a	7,0 ^b	7,1 ^b	7,6 ^{c,d}	5,8 ^a	6,0 ^b
Cólon dorsal direito	9,1 ^{e*}	8,1 ^{b*}	5,6 ^{b*}	4,7 ^{b*}	7,4 ^b	7,0 ^b	7,4 ^b	6,9 ^b	6,5 ^{b,c,d*}	5,9 ^{a,b*}
Reto	8,6 ^c	8,3 ^{b,e}	5,2 ^b	5,0 ^{b,c}	7,5 ^b	7,4 ^c	7,4 ^b	7,8 ^{c,d}	6,3 ^{b,d}	6,2 ^{b,c}

Legenda: D1 = dieta rica em fibras; D2 = dieta rica em amido.

*Valores diferentes entre dietas entre cada grupo na mesma porção digestiva (P<0,05).

^{a, b, c, d, e} Letras distintas na mesma coluna são diferentes (P< 0,05).

Fonte: De Fombelle et al. (2003).

As principais funções da microbiota digestiva são: resistência à instalação e multiplicação de microorganismos exógenos (efeito barreira e/ou exclusão competitiva), estimulação de resposta imunológica mais rápida e adequada em caso de agressão infecciosa (imunomodulação) e auxílio na regulação da fisiologia digestiva e fornecimento de nutrientes (contribuição nutricional).

A microbiota normal induz diversas mudanças na anatomia e fisiologia da parede das células intestinais do hospedeiro, devido à presença desses microorganismos e/ou produção de ácidos graxos voláteis, especialmente butirato. Os principais benefícios, que auxiliam na capacidade digestiva e defesa contra patógenos são: aumento no tamanho da borda em escova das células intestinais; aumento de tecido linfóide e tecido conectivo; produção de muco; vascularização intestinal (através das células de Paneth); acidificação do estômago, produção enzimática e produção de substâncias que inibem ou matam patógenos (Servin, 2004; Stappenbeck et al., 2002; Whiteley et al., 1996; Bergman, 1990; Savage, 1986).

Van der Wielen et al. (2000) estudaram a correlação dos ácidos graxos voláteis (AGV) com o desenvolvimento da microbiota normal do ceco de frangos de corte mantidos em granjas comerciais e observaram correlações negativas entre o número de *Enterobacteriaceae* (incluindo *Salmonella*) e acetato. As hipóteses levantadas pelos autores para essa redução bacteriana foram o efeito bacteriostático ou bactericida dos AGV produzidos, pois a forma não dissociada destes se difunde livremente pela membrana bacteriana e, dentro da célula, são tóxicos por causarem redução do pH interno. Como esse efeito não ocorre no *Lactobacillus*, isso promove o mecanismo de exclusão competitiva contra patógenos.

A microbiota digestiva exerce atividade imunomodulatória no hospedeiro, mas não se conhece, com precisão, quais propriedades probióticas, tais como capacidade de aderência e colonização, são requeridas para que esse benefício ocorra. A colonização parece estar associada com a maturação dos mecanismos de imunidade humoral, uma vez que há relatos de que crianças recém-nascidas colonizadas por *Bacteroides fragilis* e *Bifidobacterium* spp. apresentaram mais células secretoras de IgA e IgM circulantes. Esse efeito parece estar relacionado à capacidade dos microorganismos de interagirem com as placas de Peyer e células intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e migração de células T para o intestino (Coppola e Turnes, 2004; Isolauri et al., 2004, citados por Saad, 2006).

Essa população microbiana também age, especificamente, como componente do sistema de defesa não imunológico animal, através da exclusão de microorganismos potencialmente patogênicos. Ela evita a colonização de oportunistas através de competição por espaço e nutrientes (Servin e Coconnier, 2003) e pela produção de substâncias com ação antimicrobiana (Servin, 2004). Essa hipótese explicaria a necessidade da administração continuada e em elevadas doses dos probióticos (Coppola e

Turnes, 2004), além da importância da manutenção da viabilidade dos microorganismos vivos presentes no produto.

O pH e potencial redox do sistema digestório de animais com microbiota digestiva normal é menor do que em animais dissociados de sua microbiota (axênicos ou isentos de germes) por causa do metabolismo microbiano, com produção de AGV e consumo de oxigênio livre por bactérias anaeróbias facultativas. Newbold et al. (1996) observaram que a respiração de microorganismos aeróbios, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como probiótico em ruminantes, foi benéfica para a microbiota ruminal, por reduzir a concentração de oxigênio livre que é tóxica e inibe a proliferação ou adesão dessas bactérias. Porubcan (1990) complementou citando que a redução do potencial redox age como um fator inibitório para patógenos, como *Salmonella* e *Shigella*, tendo uma ação benéfica indireta para as bactérias anaeróbias e demonstrando novamente as relações de mutualismo entre microbiota-hospedeiro.

A contribuição nutricional é um importante benefício observado em equinos, pois estes são capazes de aproveitar alimentos fibrosos como fonte alimentar através da fermentação realizada pela microbiota celulolítica presente no intestino grosso. A degradação de substratos não-digeridos na porção pré-cecal do trato digestivo (hemiceluloses, celulose) e secreções endógenas (muco, células de descamação, imunoglobulinas e enzimas digestivas) presentes no lúmen são a principal função metabólica da microbiota endógena. Os principais produtos de tais oxidações anaeróbias são gases (metano), H₂, CO₂, AGV, ácido láctico, etanol, ácidos graxos de cadeia ramificada (oriundos da degradação de aminoácidos), amônia, aminas, fenóis e índoles (Roberfroid et al., 1995). O pico de produção de metano em equinos (menos de 3% da ingestão energética total) foi observado após seis a oito horas da alimentação, sendo maior nos animais alimentados com concentrados ou com uma alta ingestão alimentar (Hintz e Cymbaluk, 1994).

Os AGV constituem a maior fonte de energia para os ruminantes, sendo que nos equinos são responsáveis por 30 a 80% dos requisitos energéticos de manutenção (Nutrients..., 2007; Bergman, 1990; Argenzio, 1975). Eles são absorvidos e utilizados como fonte de carbono e energia, variando seu local de metabolização de acordo com os níveis relativos de acetil-CoA, propionil-CoA e butiril-CoA sintetases nos diferentes tecidos do hospedeiro. O butirato é metabolizado primariamente pelo epitélio intestinal, onde é convertido em corpos cetônicos ou oxidado em CO₂ (representam 60-70% das necessidades energéticas dos colonócitos). O propionato é transportado para o fígado via sistema porta, sendo utilizado como precursor da gliconeogênese. E o acetato é utilizado pelos tecidos periféricos, como os músculos esquelético e cardíaco, podendo também ser utilizado pelos adipócitos na lipogênese (Hooper et al., 2002; Savage, 1986).

Na maioria dos mamíferos, inclusive equinos, a forma aniônica de ácido acético, ou acetato, é o principal AGV produzido, variando as relações molares de acetato, propionato e butirato de 75:15:10 a 40:40:20, dependendo da dieta (Bergman, 1990). A relação de acetato:propionato é importante para os equinos, pois apenas o propionato é convertido de forma significativa em glicose. Pethicket et al. (1993), citados pelo Nutrients... (2007), estimaram que 30% da energia utilizada no membro posterior de equinos em repouso ocorreu pela oxidação de acetato. Aproximadamente 7% da produção de glicose total em equinos provem do propionato produzido no ceco (Hintz e Cymbaluk, 1994), podendo esse AGV corresponder por 57 a 68% da glicose oriunda do volumoso (Simmons e Ford, 1991).

Outra ação observada, como a redução de componentes do alimento com possíveis efeitos adversos, tais como fatores antinutricionais, ocorreria através da fermentação microbiana. Essa degradação também seria benéfica por produzir vitaminas, e incrementar a digestibilidade de nutrientes, esse último graças à produção de enzimas e alteração do metabolismo microbiano (Saad, 2006; Coppola e Turnes, 2004; Hull et al., 1992; Vanbelle et al., 1990; Sissons, 1989).

A produção de fitase endógena pela microbiota digestiva equina seria outra contribuição nutricional importante para espécie. Os fitatos (ácido fítico ligado a moléculas de íons metálicos bivalentes, aminoácidos e proteínas) constituem cerca de dois terços do fósforo (P) presente nos vegetais, principalmente cereais (soja, milho, trigo, arroz, etc). Esse quelante indisponibiliza minerais bivalentes (P, Ca, Mg, Zn, Fe) para absorção no intestino delgado de monogástricos. Os suínos e aves são praticamente incapazes de utilizar o P fítico presente na dieta, devido à baixa produção endógena de fitase em seus tratos digestivos. Nos poligástricos, as bactérias celulolíticas presentes no rúmen produzem fitase endógena que torna o P fítico disponível para absorção no intestino delgado. Os equinos possuem um intestino grosso com população microbiana semelhante à do rúmen, onde também há produção da fitase endógena (Pagan, 1990), porém quando a dieta dos equinos é rica em concentrados, a quantidade de fósforo

absorvido no intestino delgado aumenta muito (Lopes et al., 2003; Schryver et al., 1972), podendo aparecer os efeitos deletérios dos fitatos na espécie.

Portanto, a microbiota digestiva exerce papel de extrema importância na saúde animal, e, conseqüentemente, vem crescendo o interesse pela manipulação destes microorganismos para maximizar sua ação benéfica ao hospedeiro (Losada e Olleros, 2002).

1.2.1.2. Utilização de probióticos na espécie equina

Os probióticos foram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (Fuller, 1989). Outras definições foram publicadas nos últimos anos, sendo internacionalmente aceito que esses aditivos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Guidelines..., 2002).

Os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são basicamente os mesmos atribuídos à microbiota digestiva: produção de substâncias antagonistas que inibem ou matam patógenos (Servin, 2004); competição com patógenos por sítios de adesão e fontes nutricionais (Servin e Coconnier, 2003); imunomodulação do hospedeiro (Ezendam e van Loveren, 2006); e inibição da produção ou ação de toxinas bacterianas (Brandão et al., 1998). Os três primeiros mecanismos são normalmente atribuídos às bactérias produtoras de ácido láctico, enquanto os dois últimos são mais específicos de leveduras.

Os produtos probióticos comumente destinados aos equinos são compostos por culturas bacterianas vivas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Bacillus subtilis*, e culturas das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*; sendo comumente utilizados no combate de problemas associados com estresse, tais como falha na ingestão de colostro, desmame, mudanças na alimentação, transporte, clima adverso, doenças recorrentes, animais debilitados nutricionalmente, e antibióticoterapia prolongada. Esses aditivos estão disponíveis sob várias formas de apresentações, tais como pós, pastas, gel, bolus, cápsulas e *drenches*, sendo administrados via oral, sobre o alimento ou na água de bebida (Lewis, 2000; Montes e Pugh, 1993). Apesar de uma série de produtos comerciais a base de probióticos serem vendidos para uso em equinos, não há resultados publicados que justifiquem sua ampla utilização na espécie.

Weese et al. (2004) isolou um microorganismo equino-específico (*Lactobacillus pentosus* WE7), com boa capacidade inibitória *in vitro* contra patógenos entéricos, mas que induziu diarreia em potros neonatos quando utilizado como agente probiótico (Weese e Rousseau, 2005). Por outro lado, Yuyama et al. (2004) ao avaliarem o efeito da colonização precoce *Lactobacillus* espécie-específico em potros neonatos, fornecidos através de probiótico, quanto a peso corporal, características fecais e ocorrência de diarreia, verificaram menor incidência de diarreias e melhoria no crescimento, achando diferenças significativas quanto ao peso corporal em potros de com um mês de idade e menor incidência de diarreias até três semanas de idade.

Parraga et al. (1997) observaram que a administração de probióticos durante o período pós-operatório de equinos que sofreram cólica e foram submetidos à cirurgia não afetou na proliferação de *Salmonella* nas fezes, ocorrências de diarreia, duração da terapia antimicrobiana e tempo de hospitalização. Por outro lado, Ward et al. (2004) encontraram redução na presença de *Salmonella* em equinos hospitalizados sem doenças gastrointestinais suplementados com probiótico. E Desrochers et al. (2005), observaram que a administração de 10×10^9 *Saccharomyces boulardii* vivas, a cada 12 horas, durante 14 dias, resultou na redução da gravidade e duração dos sinais clínicos associados com enterocolite em comparação com equinos do grupo placebo.

Diversos estudos comprovaram a melhoria da digestibilidade dos nutrientes com a utilização de probióticos na dieta de equinos, especialmente sobre a fração fibrosa dos alimentos (Furtado et al., 2010; Jouany et al., 2009; Moura et al., 2009, 2010; Medina et al., 2002; Hill e Gutsell, 1998; Moore et al., 1994; Kim et al., 1991). Alguns trabalhos observaram efeito dos probióticos sobre a disponibilidade de minerais, como fósforo, cálcio e magnésio (Moura et al., 2010; Switzer et al., 2003, citado no Nutrients..., 2007; Pagan, 1990). No entanto, existe uma grande variação nos resultados observados nesses estudos, provavelmente devido às diferenças na concentração e dosagem dos aditivos testados, interação

entre composição da dieta, grupos experimentais e tempo de adaptação à dieta. Newbold et al. (1996) ao estudarem o modo de ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo para ruminantes, concluíram que a respiração desse microorganismo foi benéfica para as bactérias anaeróbicas do rúmen, pois diminui a concentração de oxigênio, que é tóxico e inibe o crescimento ou adesão dessas bactérias.

O Nutrients... (2007) diferenciou os efeitos dos probióticos compostos por bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*) ou por leveduras (*Saccharomyces* spp. e *Aspergillus oryzae*), sendo aqueles mais utilizados para fins terapêuticos, como recuperação e/ou prevenção de distúrbios gastrointestinais. No caso das leveduras, estes são utilizados para melhoria do aproveitamento da dieta, sendo necessário diferenciar qual tipo está presente no produto: levedura desidratada ativa (mín. 15×10^9 UFC/g células vivas - mín. 40% PB); cultura de levedura (produto desidratado contendo células vivas e meio na qual foram cultivadas); extrato de levedura (prod. desidratado ou concentrado de conteúdos celulares mortos – mín. 9% PB). De acordo com a definição de probióticos, apenas as duas primeiras categorias são consideradas aditivos probióticos por serem compostos por microorganismos vivos.

Com relação aos efeitos dos probiótico sobre o desempenho zootécnico de potros, Glade (1991a,b) avaliou os efeitos da suplementação com *S. cerevisiae* em éguas no terço final de gestação e no início da lactação sobre a produção e composição do leite materno e sobre a taxa de crescimento dos seus respectivos potros nos primeiros 56 dias de idade. Os potros que eram filhos das éguas suplementadas tiveram maiores taxas de ganho de peso a partir dos 28 dias de idade e maior crescimento de altura na cernelha dos 42 aos 56 dias de idade, em função do aumento na produção quantitativa e qualitativa do leite de suas mães. Glade e Sist (1990) observaram melhoria no ganho de peso, altura e eficiência alimentar de potros recém desmamados suplementados com cultura de leveduras vivas.

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes pré-requisitos: ser inócuo ao hospedeiro, ao homem e ao meio ambiente; ser habitante normal do trato digestivo de animais saudáveis e espécie-específicos; ser capaz de produzir culturas viáveis em concentrações efetivas e com baixos requisitos para cultivo; ter sua eficiência comprovada no hospedeiro em questão; tolerar o baixo pH do suco gástrico, sais biliares e secreções pancreática e intestinais; ser capaz de ser ativado e multiplicar rapidamente, após ingestão do produto; ser capaz de se aderir às células epiteliais do intestino, ao menos temporariamente; produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino; não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, não possuindo propriedades anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas; assim como resistir a fagos e ao oxigênio; manter-se viável durante a estocagem e transporte (inclusive em longos períodos); resistir aos antibióticos, altas temperaturas de processamento e outras condições tecnológicas. É desejável que essas cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo a condições de processamento como a liofilização ou secagem por *spray drying* (Saad, 2006; Coppola e Turnes, 2004; Vanbelle et al., 1990).

Embora ainda não existam cepas probióticas que cumpram todos os critérios citados anteriormente, o que se busca na prática seria a utilização de produtos que, após ingestão em doses efetivas, forneçam microorganismos na forma viável e que sejam capazes de se estabelecer no trato digestivo, agindo na manutenção e/ou modulação da microbiota digestiva normal, e prevenindo desordens digestivas e/ou aumentando o desempenho zootécnico.

1.2.2 Fitase exógena

As fitases exógenas são mundialmente usadas como aditivos na dieta de monogástricos. Essas enzimas podem aumentar a absorção do fósforo fítico (Adebisi et al., 2009 - frangos de corte; Silversides e Hruby, 2009 - poederias; Chu et al., 2009 – suínos; Dunnett et al., 2009 - equinos), o que é de grande interesse para nutrição humana e animal, assim como para o meio ambiente. Por outro lado, vários assuntos associados com o uso dessas enzimas permanecem não esclarecidos por causa de resultados ambíguos e, às vezes, conflitantes observados na literatura.

1.2.2.1. Fundamentos para utilização da fitase exógena

O ácido fítico é descrito quimicamente com uma molécula de hexaquifosfato de D-mio-inositol (1,2,3,4,5,6), composta por um anel de inositol ligado com pelo menos um grupo fosfato, sendo a forma química mais abundante nos vegetais. É o principal estoque de fósforo (P) nas sementes de cereais, legumes, nozes e oleaginosas, correspondendo por 60-90% do P total e 1,5% da matéria seca presente nelas. Sua biosíntese inicia logo após o florescimento da planta, havendo seu acúmulo durante o desenvolvimento até maturação e dessecação da semente, em vacúolos denominados globóides. A localização dos estoques do ácido fítico varia nas plantas, estando acumulado nas células da camada aleurona e apenas uma quantidade mínima no embrião nos grãos de trigo, cevada e arroz, enquanto no milho essa distribuição é justamente oposta no milho (Bohn et al., 2008; Frontela et al., 2008; Raboy, 2003).

A solubilidade dos complexos ácido fítico:metal são baixos no pH da maior parte dos intestinos animais. Consequentemente, os fosfatos negativamente carregados do fitato ligam-se fortemente a cátions metálicos de Ca, Fe, K, Mg, Mn e Zn, tornando-os insolúveis e indisponíveis. Portanto, o ácido fítico é considerado um importante fator antinutricional na dieta de humanos e animais, por causa da inabilidade destes em degradar e absorver minerais ligados ao fitato no sistema digestório de monogástricos. A concentração de fitato e fósforo são maiores no farelo de trigo do que no grão inteiro e invariavelmente essa molécula está presente em dietas de aves e suínos, em concentrações de aproximadamente 10 g/kg (Selle et al., 2009; Bohn et al., 2008).

Quando os principais ingredientes utilizados na dieta para monogástricos são trigo, arroz e milho, o excesso de fitato presente nesses grãos pode causar deficiências minerais e má nutrição. Portanto, a remoção ou degradação do fitato pode aumentar a biodisponibilidade de minerais bivalentes e o valor nutricional da dieta, bem como reduzir a poluição ambiental.

Uma primeira estratégia para remoção do ácido fítico seria através da ativação das fitases endógenas presentes nas sementes. Isso pode ser alcançado por meio da moagem, encharcamento dos cereais em soluções aquosas ou germinação por 48 horas. As duas primeiras técnicas apresentam o inconveniente de também causarem perda de minerais e outros componentes nutricionais. A germinação permite uma desfitinização bem sucedida, podendo chegar a 40% do conteúdo, mas sua eficiência dependerá da atividade de fitase da espécie vegetal. Trigo, cevada e centeio possuem mais atividade de fitase nos grãos, enquanto milho, milheto e sorgo têm baixa atividade de fitase que aumenta rapidamente após a germinação (Bohn et al., 2008; Frontela et al., 2008).

Uma segunda estratégia seria a redução da concentração de ácido fítico das sementes por meio de modificação genética ou alterações transgênicas. Grãos mutantes “lpa” apresentaram redução do conteúdo de fitato através da remoção de genes envolvidos com biosíntese de ácido fítico. Com exceção de um mutante de cevada que acumulou ferro, a composição mineral não foi muito alterada nos mutantes “lpa”, indicando não haver ligação direta entre distribuição mineral e biosíntese de ácido fítico. O problema dessa alternativa foi o papel dos fosfatos de inositol no metabolismo celular vegetal, afetando consequentemente na germinação quando reduzidos em mais de 50%. Pouco se sabe sobre o impacto dessas mutações sobre parâmetros de qualidade agrônômica, tais como resposta ao estresse e susceptibilidade dos vegetais às doenças (Bohn et al., 2008; Frontela et al., 2008). Holm et al., 2002, citado

por Bohn et al. (2008), relatam o desenvolvimento de produtos transgênicos de trigo, modificados através da introdução do gene *phyA* da enzima fitase produzida pelo *Aspergillus niger*.

Por fim, a terceira estratégia usada para redução dos efeitos antinutricionais do fitato seria a adição de fitase exógena no alimento ou dieta, sendo essas enzimas produzidas por bactérias ou leveduras. Essa alternativa tem sido bastante estudada e aplicada na produção animal (Bohn et al., 2008, Frontela et al., 2008; Singh, 2008; Bedford, 2000).

Segundo Bohn et al. (2008), o termo fitase (hexaquifosfato mio-inositol (1,2,3,4,5,6) fosfohidrolase) é definido como uma classe de fosfatases com capacidade *in vitro* para liberar pelo menos um grupamento fosfato do ácido fítico e potencialmente minerais quelatados. A primeira pesquisa sobre fitase remonta à sua descoberta por Suzuki e colaboradores em 1907 e quando os produtos comerciais de fitase foram inicialmente fabricados e lançados no mercado por Gist Brocades (atual DSM em 1991). Durante os últimos 20 anos, as fitases e seus microorganismos produtores tem sido estudadas pela comunidade científica e industrial ligada a nutrição animal, proteção ambiental e saúde humana (Fu et al., 2008).

As fitases exógenas são classificadas de acordo com sua origem, a posição inicial da hidrólise no carbono do anel de mio-inositol e seu pH ótimo de ação (tabela 4). As fitases são comumente encontradas na natureza, podendo ser de origem microbiana, vegetal ou animal. As fitases de origem microbiana são produzidas por espécies de fungos (*Aspergillus*), leveduras (*Saccharomyces* e *Peniophora*) e algumas bactérias (*Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*). Com relação ao pH ótimo de ação, as enzimas podem ser classificadas em ácidas ou alcalinas (Frontela et al., 2008).

Considerando-se a posição do carbono no anel de mio-inositol do ácido fítico por onde começará o processo de desfosforilação, as enzimas são classificadas em 3-fitase (E.C. 3.1.3.8), 6-fitase (E.C. 3.1.3.26) e 5-fitase (E.C. 3.1.3.72). As 3-fitases são encontradas nos animais e microorganismos e as 6-fitases estão presentes nos vegetais. As fitases de origem microbiana realizam a hidrólise da molécula de fitato de forma coordenada, ou seja, depois de ser liberado o grupo fosfato da posição 3 da molécula, a reação continua na seguinte ordem: carbono 4, 5, 6 e 2 (Frontela et al. 2008).

Tabla 1. Principales características de algunos de origen microbiano, vegetal o animal

Tipo	Organismo productor (origen)	Clasificación segundo pH	Extracción química	Particularidades	Uso de la Microbiana (propósito de uso como no animal de beneficio)	Procedencia	pH óptimo para este uso	Temperatura óptima para este uso	Referencias bibliográficas
3-Suero (BC 3.1.3.8) ^A	Proteos y bacterias ácido láctico	ácido	Proteínas como el grupo de "proteínas" (GPP) Proteínas lácticas del GHP	Es el producto líquido o sólido de Co. con relación a los grupos de proteínas que se denominan "proteínas" o "proteínas" que se denominan por sus propiedades físicas y químicas (2008), las proteínas de origen de <i>Streptococcus</i> o de su actividad similar. Es el producto que resulta de la separación de los sólidos y líquidos que se denominan "proteínas" para los fines. Componentes de este grupo "proteína" (GHP) (GHP) y HD).	Producto CS	Industria láctea	6.0 - 8.0	55-60°C	Baba et al. (2008); Pardo et al. (2008); Pardo et al. (2008)
5-Suero (BC 3.1.3.7) ^A	Lactosa que se produce en el	alcalino	Proteínas lácticas del GHP	Como se refiere a los otros, presenta una biología de separación de los sólidos y líquidos que se denominan "proteínas" (GHP) y HD).	Producto CS	Industria láctea	8.0	40°C	Baba et al. (2008)
46-Suero (BC 3.1.3.6) ^A	Proteína	ácido	Proteínas lácticas del GHP (relacionado con BC 3.1.3.8 - uso de GHP) Proteínas lácticas (relacionado con BC 3.1.3.8)	Presentación de los productos lácteos y sólidos en forma de serbón CS en CS.	Producto CS Producto CS (presentado en forma vegetal según el producto CS)	Industria láctea	4.0 a 6.0 (en lacteos lácteos fresco)	40 a 60°C	Baba et al. (2008); Pardo et al. (2008)

^A No se menciona en el artículo de origen microbiano, vegetal o animal. Fuente: Universidad de Chile, Facultad de Biología, Departamento de Biología Molecular (DIBMO).

A atividade da enzima fitase é expressa em unidades de atividade de fitase (FTU), sendo definida como a quantidade de fitase que libera 1 micromol (μmol) de fosfato inorgânico por minuto de uma solução de 0,0051 mol por litro de fitato de sódio em pH de 5.5 e temperatura de 37°C (Phytase...,2005). A atividade enzimática presente em diferentes cereais é alta no trigo (2078 FTU/kg), centeio (5453 FTU/kg) e tritcale (1100 FTU/kg), mediana na cevada (925 FTU/kg) e mais baixa no arroz (120 FTU/kg), milho (12 FTU/kg), sorgo (24 FTU/kg), soja (31 FTU/kg) e aveia (42 FTU/kg) (Venekamp e Somers, 1995; citados por Frontela et al., 2008). As fitases microbianas apresentam uma atividade geralmente elevada, no mínimo de 5000 FTU/g, embora existam variações segundo o microorganismo produtor (Greiner e Farouk, 2007, citados por Frontela et al., 2008). Além dessa maior capacidade de produção, as fitases de origem microbiana possuem maior estabilidade físico-química quando comparadas com as de origem vegetal, tornando-as de melhor potencial tecnológico para indústria alimentícia.

É de grande importância conhecer as condições ótimas de atividade da enzima fitase utilizada (pH, temperatura), tendo em vista que essas condições variam de acordo com o tipo de enzima utilizada (vide tabela 4). Segundo Frontela et al. (2008), a maioria das fitases originárias de cereais apresentam um pH ótimo de atividade entre 4,5 a 5,6, embora as oriundas de leguminosas apresentem pH ótimo na faixa igual ou superior a 7.

Outro fator importante que influencia na atividade da fitase é sua afinidade e especificidade ao substrato. Segundo Fu et al. (2008), as fitases do tipo fosfatases homólogas ao “beta-propelles” (BPPs) possuem alta especificidade para o complexo cálcio-fitato e não possuem atividade enzimática para outros ésteres de fosfato. O cálcio é exigido no substrato porque as BPPs só podem hidrolisar o complexo cálcio-fitato; mas o Ca^{2+} livre e fitato, que não estão complexados, são inibidores competitivos. Portanto, os autores concluíram que o Ca^{2+} atua tanto como ativador como inibidor dessa classe de fitase.

A concentração de Ca e P dietético influencia na atividade da fitase, havendo uma redução da ação dessa enzima em dietas com elevado nível de fontes inorgânicas desses minerais, ou relação Ca:P na proporção de 2:1 na dieta. Há pelo menos três hipóteses para explicação dos efeitos nocivos do Ca sobre a ação da fitase: 1) formação de complexo insolúvel do mineral com fitase, evitando a hidrólise do fitato, 2) influência no pH intestinal, proporcionando um ambiente intestinal desfavorável para atividade da fitase microbiana, 3) supressão da atividade da fitase, ao competir diretamente pelos sítios ativos da enzima. A hidrólise do fitato também reduz em dietas com alto nível de P inorgânico, ocorrendo o inverso (maior liberação de fósforo fítico) quando há um nível inferior desse mineral na dieta (Singh, 2008).

Segundo Konietzny e Greiner (2004), dependendo da aplicação tecnológica da fitase exógena, esse aditivo deve apresentar os seguintes pré-requisitos: ser efetivo para liberar o P fítico no trato digestivo; ser estável para resistir à inativação pelo calor durante processamento e estocagem dos alimentos; ser produzido em condições economicamente viáveis. A termoestabilidade é particularmente um assunto importante, uma vez que alimentos peletizados são comumente submetidos a temperaturas entre 65 a 95 °C e utilizados na nutrição animal.

A suplementação com fitase exógena em ruminantes não se faz necessária, uma vez que microorganismos presentes na microbiota ruminal produzem fitase endógena, permitindo a hidrólise e absorção do P fítico no trato digestivo posterior aos pré-estômagos. Diversas fitases foram isoladas em *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Raoultella* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter* e bactérias anaeróbicas ruminais, particularmente *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella* sp., *Mitsuokella multiacidus* e *Mitsuokella jalaludinii* (Konietzny e Greiner, 2004). Nakashima et al. (2007) citaram a descoberta de uma classe única de fitase isolada da cepa ruminal de *Selenomonas ruminantium* JY35, caracterizada pela presença da proteína tirosina fosfatase (PTP) e sítio ativo (HCXXGXGRT).

No caso dos animais monogástricos, devido à ausência ou quantidade insuficiente de fitase no trato digestivo, as fitases exógenas são frequentemente adicionadas nas rações para melhorar o desempenho e diminuir a suplementação de fosfato inorgânico, com conseqüente redução da poluição de fósforo nos sistemas de criação intensiva. Tais benefícios esperados (ambientais, econômicos e nutricionais) levaram ao notório crescimento nas vendas desse aditivo para nutrição de monogástricos, atingindo quase US\$ 500 milhões em vendas em 2000 (Fu et al., 2008; Mullaney et al., 2000, citados por Nakashima et al., 2007). Segundo Sabastian et al. (1998), citados por Adebisi et al. (2009), a excreção de

P em monogástricos pode ser reduzida em aproximadamente 30% através da suplementação de fitase exógena na dieta.

Dentre as espécies monogástricas de interesse zootécnico, o uso de fitases exógenas tendo sido melhor estudada e aplicada na avicultura. O P é um dos minerais mais requisitados pelos frangos de corte para um desenvolvimento ósseo adequado e pelas poedeiras para formação da casca dos ovos. Além disso, esse mineral é um dos nutrientes mais caros na nutrição animal, abaixo apenas das fontes de energia e proteína. As doses testadas na avicultura variam de 250 a 1500 FTU/kg da dieta e geralmente resultaram em aumento na absorção de P, com redução da quantidade da necessidade de suplementação com P inorgânico, e consequente melhorias no ganho de peso, conversão alimentar, mortalidade, ingestão alimentar e mineralização óssea (Adebiyi et al., 2009; Assuena et al., 2009; Tugba Bingol et al., 2009; Singh, 2008).

1.2.2.3. Utilização de fitase exógena na espécie equina

Poucos trabalhos foram desenvolvidos para avaliação da suplementação com fitase exógena na dieta de equinos. Patterson et al. (2002) avaliaram o efeito da suplementação de dosagens crescentes dessa enzima na dieta de equinos e não observaram nenhum efeito desse aditivo sobre a excreção fecal e urinária de P, justificando esse resultado devido à grande quantidade de P contida nas dietas, a relação Ca:P utilizada para equinos (1:1 a 6:1) ou dosagens insuficientes. Esses resultados concordaram com o trabalho de Morris-Stoker et al. (2001), citado por Patterson et al. (2002), que também não observaram efeito da suplementação de fitase na excreção fecal e urinária, digestibilidade verdadeira e retenção de P em equinos alimentados com dietas com 50% de feno e concentrado.

Hainzea et al. (2004) também não observaram efeito da fitase exógena na digestibilidade e excreção fecal de P de equinos, embora tenha havido uma interação entre enzima e dieta, sendo menor a excreção fecal de P na dieta composta por concentrado comercial a base de milho, aveia, melão e farelo de soja. Van Doorn et al. (2004) verificaram efeito benéfico da fitase na absorção do cálcio, e não do P, de animais alimentados com dietas ricas em fitato.

Moura et al. (2009, 2010) não observaram efeitos da suplementação com 544 FTU/kg de concentrado de fitase na dieta sobre a disponibilidade aparente de minerais ou eficiência alimentar (ganho de peso ou conversão alimentar) de potros desmamados Mangalarga Marchador. Os autores verificaram aumento na digestibilidade da fibra em detergente neutro desses animais, sugerindo que o aditivo pode ter auxiliado na manutenção da microbiota celulolítica ao neutralizarem os AGV derivados do metabolismo bacteriano por meio da formação de sais de acetato, butirato e lactato no ceco e cólon.

Por outro lado, Dunnett et al. (2009) encontraram aumento na disponibilidade aparente do P em equinos alimentados com concentrado contendo 0,4 kg fitase por tonelada (cerca de 600 FTU/kg concentrado). A dieta fornecida aos equinos desse trabalho teve uma redução de 0,8% da inclusão do fosfato bicálcico e os autores justificaram o resultado encontrado pelo fato de utilizar metodologia experimental que considerou um dos fatores que interferem na ação da fitase (altos níveis de Ca:P dietéticos), além do concentrado fornecido aos animais ter sido oferecido em três pequenas porções diárias, favorecendo a ação dessa enzima no estômago.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO CORPORAL DE POTROS MANGALARGA MARCHADOR ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM PROBIÓTICOS OU FITASE EXÓGENA

Resumo: Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com probióticos ou fitase sobre o desenvolvimento corporal de 16 potros Mangalarga Marchador, dos 173±8 dias (desmame) aos 363±12 dias de idade. Os grupos experimentais foram: **A-** dieta (pastagem de *Cynodon* + 1,2kg/100kg PV de concentrado + água e sal mineral *ad libitum*); **B-** dieta + 5g/dia de leveduras (10^9 ufc/g *S. cerevisiae*); **C-** dieta + 2g/dia de bactérias (10^8 ufc/g *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*) e leveduras (10^5 ufc/g *S. cerevisiae*) e **D-** dieta + 544 FTU/kg concentrado/dia de fitase. O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo de parcelas subdivididas, sendo os resultados de ganhos de peso vivo, de medidas corporais, índices de conformação, parâmetros sanguíneos, médias e ganhos mensais de índice cortical do metacarpo direito comparados pelo teste SNK ($P<0,05$) e cálculos de regressão ($P<0,10$). Os aditivos testados não afetaram as variáveis avaliadas ($P>0,05$), exceto ganho mensal de índice cortical que foi maior no grupo **B** aos 273 dias ($P<0,05$). O probiótico composto por *S. cerevisiae* influenciou positivamente na mineralização óssea de potros aos 100 dias pós desmame, sendo necessárias mais pesquisas para confirmação dos efeitos dos probióticos ou fitase no crescimento de potros.

Palavras-chave: aditivos, bactérias produtoras de ácido láctico, crescimento, enzimas, equinos, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract: The objective was to assess the effects of probiotic or phytase supplementation on body development of 16 Mangalarga Marchador colts, of 173±8 days (weaning) to 363±12 days of age. Groups were: **A-diet** (*Cynodon* pasture + 1.2 kg/100 kg BW of concentrate + water and mineral salt *ad libitum*); **B-diet**+5 g/day of yeast culture (10^9 CFU/g *S. cerevisiae*); **C-diet**+2g/day of bacteria (10^8 CFU/g *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*) and yeast culture (10^5 CFU/g *S. cerevisiae*); and **D-diet** + 544 FTU/kg concentrate/day of phytase. All foals were randomized, by replicated, using a split-plot arrangement, and results of body weight gains, body measurements, conformation index, blood parameters, means and gains of cortical index of the right third metacarpus were compared using SNK test ($P<0,05$) and regression calculations ($P<0.10$). The additives tested did not affect the variables evaluated ($P>0.05$), except cortical index gains that was higher in B group at 273 days. The probiotic composed of *S. cerevisiae* had a positive influence on bone mineralization of foals at 100 days after weaning, and more research are needed to confirm the effects of probiotics or phytase on growth of foals.

Keywords: additives, enzymes, growth, horses, lactic acid-producing bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*

2.1 Introdução

O crescimento de equinos jovens é avaliado através do ganho de peso vivo e de medidas corporais, como altura na cernelha, altura na garupa, comprimento do corpo, comprimento da cabeça, perímetro torácico e perímetro da canela (Nutrients..., 2007; Pinto et al., 2005b; Cabral et al., 2004b; Rezende et al., 2000a; Saastamoinen, 1990b). A altura na cernelha máxima de equinos adultos é determinada geneticamente, mas o desenvolvimento corporal (tamanho e taxa de crescimento) dos potros pode ser influenciado por vários fatores, tais como: sexo, mês de nascimento, condições climáticas, nutrição e manejo (Vasconcelos et al., 2010; Heusner, 1992).

Segundo Rezende et al. (2000a,b), as raças equinas de sela alcançam cerca de 80% de sua altura na cernelha esperada quando adultas aos seis meses de idade, época quando se realiza o desmame na maioria dos criatórios, e com 12 meses de idade os potros atingem 90% da altura esperada quando adultos. Portanto, esse rápido desenvolvimento dos equinos exige que os potros sejam submetidos a um programa nutricional adequado, para que possam crescer de acordo com seu potencial genético.

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Guidelines..., 2002). Na espécie equina, esses aditivos são utilizados visando melhorias no aproveitamento da dieta, desenvolvimento corporal, condicionamento físico e prevenção e/ou recuperação de doenças; embora haja poucos trabalhos que comprovem seus possíveis efeitos benéficos na espécie. Especificamente na produção animal, existem diversos trabalhos que comprovaram a melhoria da digestibilidade dos nutrientes com a utilização de probióticos na dieta de equinos, especialmente sobre a fração fibrosa dos alimentos (Furtado et al., 2010; Jouany et al., 2009; Moura et al., 2009, 2010; Hill e Gutsell, 1998; Moore et al., 1994; Kim et al., 1991), mas são necessários estudos para avaliação dos efeitos indiretos desse benefício nutricional sobre o desenvolvimento corporal de potros criados nas condições brasileiras.

As fitases exógenas são mundialmente usadas como aditivos na dieta de monogástricos (aves e suínos), visando um aumento no aproveitamento de minerais ligados ao ácido fítico (P, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn). Como o P é de grande importância para o perfeito desenvolvimento dos ossos, o uso desse aditivo enzimático em potros poderia ser uma ferramenta nutricional para aumentar a disponibilidade do P fítico presente nos grãos, além de reduzir os custos das rações e a poluição ambiental por reduzir a necessidade de inclusão de fósforo inorgânico. No entanto, são escassos os estudos avaliando a eficácia da suplementação dessa enzima na nutrição equina (Dunnett et al., 2009; Moura et al., 2009, 2010; Hainzea et al., 2004; Van Doorn et al., 2004; Patterson et al., 2002). Diante disso, a realização de pesquisas sobre o uso desses dois aditivos em equinos poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias alimentares para melhoria do desempenho zootécnico de potros, uma categoria muito exigente em minerais. Objetivou-se nesse experimento avaliar os possíveis efeitos da suplementação com probióticos ou fitase exógena sobre o desenvolvimento corporal de potros Mangalarga Marchador criados em condições semi-extensivas.

2.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Santa Helena – Haras Catuni, situada no município de Francisco Sá – MG, durante o período de 13 de abril a 22 de novembro de 2006.

O município de Francisco Sá está localizado na região norte do Estado de Minas Gerais, a 70 km de Montes Claros e 420 km de Belo Horizonte, na bacia do Alto Médio São Francisco, situada na área do “Polígono das Secas”. O clima da região é semi-árido brando, com normais climatológicas no município de Montes Claros-MG de: 22,4°C (temperatura média anual); 29,3 °C (temperatura máxima anual); 16,7 °C (temperatura mínima anual); 66,6 % (umidade relativa do ar) e 1082,3 mm (precipitação total anual) (Normais..., 1992). As chuvas ocorrem normalmente entre os meses de outubro a março, sendo a precipitação anual na Fazenda Santa Helena, durante o ano do experimento, de 1797,5 mm (vide anexo – tabela 1).

Foram utilizados 16 potros da raça Mangalarga Marchador, filhos do mesmo garanhão e nascidos no período de 05 de outubro a 16 de dezembro de 2005. Os animais foram desmamados por

meio da retirada da mãe do piquete e em lotes, aos 173±8 dias de idade e 178±20 kg de peso vivo (PV). Eles permaneceram soltos em piquete de aproximadamente oito hectares, formado pelas gramíneas “coast cross” (*Cynodon dactylon* x *Cynodon nlemfluensis*) e estrela africana (*Cynodon nlemfluensis*), em sistema de pastejo contínuo. O concentrado foi fornecido em unidades de serviço, construídas no piquete de acordo com modelo preconizado por Carvalho e Haddad (1987). Água e sal mineral foram oferecidos em bebedouro e cocho coberto, respectivamente.

A dieta era composta pelas gramíneas do piquete, como alimento volumoso, e ração concentrada peletizada¹. A suplementação concentrada foi fornecida na proporção de 1,2 kg/ 100 kg PV, segundo recomendações do Nutrients... (1989), sendo a quantidade diária calculada de acordo com pesagens realizadas no início do período experimental e mensalmente. O concentrado foi oferecido em duas porções diárias, fornecidas às 7:30 e 15:30 horas. Água e sal mineral² foram fornecidos à vontade (consumo diário de sal mineral dos potros – **vide** anexo tabela 2).

Nas tabelas 1, 2, 3 e 4 estão representadas as composições químicas do volumoso, concentrado e sal mineral fornecidos aos animais do experimento.

Cada quatro potros nascidos cronologicamente o mais próximo possível foram sorteados para um dos seguintes grupos experimentais:

- A:** Grupo controle (1,2 kg concentrado/ 100 kg PV + volumoso, água e sal mineral à vontade)
- B:** Grupo com dieta de **A** + suplementação de leveduras vivas³ (5 g/animal)
- C:** Grupo com dieta de **A** + suplementação de bactérias e leveduras vivas⁴ (2 g/animal)
- D:** Grupo com dieta de **A** + suplementação de fitase exógena⁵ (544 FTU/kg concentrado)

Tabela 1. Composição química de matéria seca (MS), energia digestível (ED), proteína bruta (PB), lisina, extrato etéreo (EE) e oxalato dos alimentos fornecidos aos animais

Alimento	Mês 2006	MS %	ED Mcal/kg MS	PB	Lisina	EE	Oxalato
Volumoso	Abril	30,35	1,81 ^a	8,47		3,00	0,39
	Junho	43,96	1,80 ^a	5,33		3,11	0,20
	Agosto	60,27	1,15 ^b	3,67	0,38 ^c	1,65	0,30
	Outubro	32,49	1,96 ^a	11,15		3,76	0,39
	Dezembro	28,06	1,98 ^a	9,87		2,44	0,19
Concentrado ^d	-	89,97	3,65 ^b	18,89	0,87	4,36	-

^aValor estimado através da fórmula (Nutrients..., 2007): $ED = 2,118 + 0,01218*PB - 0,00937*FDA - 0,00383*(FDN-FDA) + 0,04718*EE + 0,02035*CNF - 0,0262*MM$

^bMoura et al. (2010).

^cNutrients... (1989).

^dTodos nutrientes analisados através de análise proximal, exceto lisina (nível de garantia do fabricante).

¹ Equisul Lactação 16 Floc[®] - Total Alimentos S./A., Três Corações, Minas Gerais, Brasil.

² Hiposal 80[®] - Total Alimentos S./A., Três Corações, Minas Gerais, Brasil.

³ Nível mínimo de garantia por g: 1×10^9 ufc *Saccharomyces cerevisiae*

⁴ Níveis mínimos de garantia por g: 1×10^8 ufc de 4 cepas bacterianas (*Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*) e $3,33 \times 10^5$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*

⁵ Nível mínimo de garantia por g: 5000 FTU

Tabela 2. Composição química de carboidratos da dieta fornecida aos animais

Alimento	Mês 2006	Amido	CNF ^a	FDN	HCEL	FDA	CEL	Lig
% da MS								
Volumoso	Abril	16,25	8,14	70,79	35,71	35,08	28,19	6,89
	Junho	26,33	9,23	73,13	37,05	36,08	28,61	7,47
	Agosto	22,94	4,26	82,25	36,63	45,62	35,63	9,99
	Outubro	27,70	9,09	68,01	34,85	33,16	26,23	6,93
	Dezembro	10,56	12,92	66,11	37,47	28,64	22,82	5,82
Concentrado	-	27,90	35,69	31,90	20,63	11,27	-	-

Legenda: CNF (carboidratos não fibrosos); FDN (fibra em detergente neutro); HCEL (hemiceluloses); FDA (fibra em detergente ácido); CEL (celulose); Lig (lignina).

^aCarboidratos não fibrosos (CNF) = 100 - (%PB + %EE + %MM + %FDN)

Tabela 3. Composição química de minerais dos alimentos fornecidos aos animais (base MS)

Alimento	Mês 2006	MM	Ca	P	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn
		(%)				(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Volumoso	Abril	9,60	0,47	0,39	0,18	70,33	31,38	6,45	44,36
	Junho	9,20	0,55	0,34	0,23	76,90	40,07	3,23	43,32
	Agosto	8,17	0,63	0,34	0,22	268,02	47,04	4,34	52,51
	Outubro	7,99	0,52	0,34	0,17	576,20	38,77	5,13	60,31
	Dezembro	8,66	0,38	0,35	0,14	576,56	27,61	4,03	86,01
Concentrado	-	9,16	1,42	1,17	0,37	1432,70	132,27	30,01	144,49

Legenda: MM (matéria mineral); Ca (cálcio); P (fósforo); Mg (magnésio); Fe (ferro); Zn (zinco); Cu (cobre); Mn (manganês).

Os aditivos testados foram administrados diretamente na boca de cada animal, durante o trato da manhã. O probiótico de leveduras vivas (grupo **B**) era um pó amarelado (desidratação por liofilização) de um único lote, fabricado em 03/10/2005, armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo do sol e umidade. O probiótico de bactérias e leveduras vivas (grupo **C**) era uma pasta azulada, armazenada em geladeira (4° C) e utilizada com até quatro meses de fabricação. A enzima fitase (grupo **D**) era um pó branco (desidratação por *spray drying*) de um único lote, que foi armazenado em geladeira (4° C) durante todo experimento.

Previamente ao desmame, os animais eram mantidos soltos juntos com as mães em piquetes e recebiam apenas suplementação mineral própria para equinos. O desmame foi realizado em três lotes, durante os meses de abril e maio de 2006, quando os potros estavam com 173±8 dias de idade (5,8±0,3 meses). Os primeiros 14 dias do experimento foram para adaptação dos animais às instalações, manejo e dieta. O período experimental foi de 189±11 dias, totalizando 223 dias de experimento para acompanhamento do desenvolvimento corporal de todos os animais até os 363±12 dias de idade.

Inicialmente foi realizado exame clínico dos animais no haras, para escolha e identificação de 16 potros saudáveis e aptos para o experimento. Eles foram vermifugados⁶ e banhados com solução carrapaticida⁷, sendo os controles de endo e ectoparasitos repetidos em intervalos de dois meses e

⁶ Equimax[®] - Virbac do Brasil, Jurubatuba, São Paulo, Brasil.

⁷ Colosso pulverização[®] - Ourofino Agronegócio, Cravinhos, São Paulo, Brasil.

mensalmente, respectivamente. Os potros receberam vacinação anti-rábica aos 302 dias de idade, de acordo com o calendário sanitário instituído na propriedade.

Tabela 4. Composição química do sal mineral fornecido aos animais do experimento (base MS)

Parâmetro	Concentração
Cálcio - %	19,78
Fósforo - %	7,72
Magnésio - %	5,92
Cobre – ppm	1041,94
Zinco – ppm	5880,96
Manganês – ppm	1575,25
Cobalto – ppm	117,38
Ferro – ppm	5727,82
Enxofre – ppm ¹	5168,49
Iodo – ppm ¹	155,05
Selênio – ppm ¹	13,95
Potássio - %	0,10
Sódio - %	10,30
Flúor ² - máximo em ppm ¹	826,96
Solubilidade P ₂ O ₅ em ácido cítrico a 2% - % mín. ¹	90,00

¹Níveis de garantia do fabricante

No desmame e em intervalos de aproximadamente 30 dias, até o final do experimento, os potros foram pesados em balança⁸ e avaliados quanto ao escore corporal (Carrol e Huntington, 1988). Essas pesagens foram utilizadas para cálculo da quantidade de concentrado a serem oferecidas diariamente para cada animal e também para cálculo dos ganhos de peso diário (GDPV) dos potros.

$$b) \text{ GDPV (kg/dia)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial (kg)}}{\text{N}^{\circ} \text{ dias}}$$

Nos mesmos dias das pesagens, os potros foram mensurados com hipômetro (altura na cernelha, altura na garupa, comprimento corporal, altura no costado) e fita métrica (perímetro torácico, perímetro de canela), segundo metodologia descrita por Camargo e Chieffi (1971).

Foram calculados os seguintes índices de conformação para classificação das proporções corporais dos potros segundo Bortoni (1991): índice corporal (IC), índice dátilo-torácico (IDT); e Oom e Ferreira (1987), citado por Cabral et al. (2004b): índice de carga de canela (ICC).

$$c) \text{ IC} = \frac{\text{Comprimento corporal}}{\text{Perímetro torácico}} \times 100$$

Onde: IC ≥ 90 (animais longilíneos); 86 ≤ IC ≤ 88 (animais mediolíneos); IC ≤ 85 (animais brevilíneos). O animal longilíneo é mais adequado para atividades esportivas de velocidade (por exemplo, equinos da raça Puro Sangue Inglês). O equino mediolíneo apresenta proporções corporais equilibradas, sendo utilizado para atividades de sela (por exemplo, equinos da raça Mangalarga Marchador). E o animal brevilíneo é robusto e destina-se a atividades de tração (por exemplo, equinos da raça Bretão).

⁸ Balança tipo romana composta modelo n° 1317 – Balanças Açores, Cambé, Paraná, Brasil.

$$d) \text{ IDT} = \frac{\text{Perímetro de canela}}{\text{Perímetro torácico}} \times 100$$

Onde: $\text{IDT} > 10,8$ (animais destinados à tração); $10,5 \leq \text{IDT} \leq 10,8$ (animais destinados à sela); $\text{IDT} < 10,5$ (animais debilitados para um equino de sela).

$$e) \text{ ICC} = \frac{\text{Perímetro de canela}}{\text{Peso}} \times 100$$

Também foram coletadas nos mesmos dias das pesagens, amostras sanguíneas dos animais através de punção na jugular em tubos tipo *vacutainer* sem anticoagulante. Estas foram imediatamente centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos para separação do soro, acondicionadas em *eppendorf* de 2 mL e congeladas a -20°C até análises no Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG para: cálcio, fósforo, magnésio, fosfatase alcalina, uréia e creatinina utilizando-se *kits* colorimétricos⁹ e leitura em espectrofotômetro digital¹⁰; concentrações séricas de proteínas totais (metodologia do biureto⁹) e de albumina, α -1 e α -2 globulinas, β -1 e β -2 globulinas, γ -globulinas, por meio de eletroforese em fitas de acetato de celulose em tampão veronal (pH 8,6) e com tempo de corrida de 45 minutos (Naoum, 1990). A leitura das fitas eletroforéticas foram realizadas com auxílio do software para densitometria por *scanner*¹¹, conforme ilustrado na figura 1.

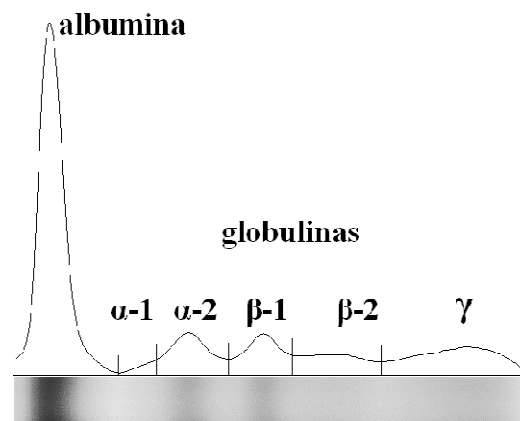


Figura 1. Fracionamento eletroforético das proteínas séricas equinas em acetato de celulose, tampão veronal pH 8,6 (leitura no software para densitometria por *scanner*)

Os animais foram radiografados na posição dorso-palmar do terço proximal do terceiro metacarpo direito aos 235, 273, 308 e 368 dias de idade, com aparelho radiográfico portátil¹², posicionado a cerca de 50 cm do foco e regulado em 65 Kv e 20 mA por 0,8 segundos. As radiografias foram imediatamente reveladas em laboratório montado na própria fazenda e posteriormente utilizadas para cálculo do índice cortical, conforme metodologia descrita por Rezende et al. (2000b):

$$f) \text{ Índice cortical (\%)} = \frac{\text{Largura óssea total} - \text{Largura cavidade medular}}{\text{Largura óssea total}} \times 100$$

⁹ Bioclin® - Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

¹⁰ Coleman modelo 35D® - Coleman Equipamentos para Laboratórios Com. E Imp. Ltda, Santo André, São Paulo, Brasil.

¹¹ Software SDS-60® - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos (CELM), Barueri, São Paulo, Brasil.

¹² FNX-85KV/25MA® - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Amostras representativas dos alimentos da dieta foram coletadas periodicamente. A colheita da gramínea foi realizada manualmente, simulando o hábito de pastejo dos equinos (Gardner, 1986), no início do experimento e a cada dois meses, sendo congeladas até posteriores análises, juntamente com amostras do concentrado e sal mineral, no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFMG para: matéria seca (MS), proteína bruta (PB), amido, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) e oxalato. Todos os parâmetros citados, com exceção de amido, FDN, FDA e lignina, foram analisados de acordo com AOAC International (Cunniff, 1995). A concentração de amido foi determinada através da metodologia descrita por Saliba et al. (2009), em aparelho para análise particular por difração a laser (Partica¹³). A concentração de FDN, FDA e lignina foram avaliadas segundo Van Soest et al. (1991). Para a ED do volumoso em agosto de 2006 e do concentrado, utilizou-se os valores citados por Moura et al. (2010). Os valores de ED da pastagem nos demais meses estudados (abril, junho, outubro e dezembro de 2006) foram estimados segundo fórmula¹⁴ citada no Nutrients... (2007).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo de parcelas subdivididas, sendo a parcela composta por quatro dietas e as subparcelas os meses de avaliação, com quatro repetições por tratamento.

A análise estatística foi feita mediante análise de variância e as médias dentro de cada faixa etária foram comparadas de acordo com o seguinte modelo matemático (SAEG, 2000):

$$Y_{ikl} = \mu + T_i + e_i + A_k + (TA)_{ik} + \alpha_{ikl}$$

Onde:

Y_{ikl} = observação do grupo experimental i , no mês k , na repetição l .

μ = efeito médio geral.

T_i = efeito do grupo experimental i , sendo $i = 1$ (grupo **A**), 2 (grupo **B**), 3 (grupo **C**) e 4 (grupo **D**).

e_i = efeito do erro aleatório atribuído à parcela no grupo experimental i .

A_k = efeito do mês k , sendo $k = 1$ (desmame) a 7 .

$(TA)_{ik}$ = efeito da interação entre grupo experimental e mês.

α_{ikl} = efeito do erro aleatório atribuído à subparcela no grupo experimental i , no mês k da repetição l .

Os resultados quantitativos (ganhos diários de peso vivo, ganhos mensais das medidas corporais, médias de índice de conformação, médias dos parâmetros sanguíneos, médias e ganhos mensais de índice cortical) foram comparados pelo teste SNK ($P < 0,05$), sendo as médias de magnésio sérico previamente transformadas por logaritmo e as médias de β -1-globulinas, β -2-globulinas e ganhos mensais de índice cortical previamente transformadas por raiz quadrada, e usadas para análise de regressão ($P < 0,10$). As médias de escore corporal dos potros foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Os procedimentos realizados nesse experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo n.º 27/2007).

¹³ Modelo LA950V2 – Horiba, Kyoto, Japão.

¹⁴ $ED = 2,118 + 0,01218*PB - 0,00937*FDA - 0,00383*(FDN-FDA) + 0,04718*EE + 0,02035*CNF - 0,0262*MM$; onde ED = energia digestível (Mcal), PB = proteína bruta (%), FDA = fibra em detergente ácido (%), FDN = fibra em detergente neutro (%), EE = extrato etéreo (%), CNF = carboidratos não fibrosos (%) e MM = matéria mineral (%)

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Peso vivo, medidas corporais e índices de conformação dos potros desmamados Mangalarga Marchador

Os valores médios, desvios-padrão e percentuais em relação à idade adulta de peso vivo (PV) dos potros alimentados com dietas suplementadas ou não com probióticos ou fitase, dos 173 dias (desmame) aos 363 dias de idade, estão descritos na tabela 5. Os resultados de PV em relação ao tempo (idade em dias) se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 99,0136 + 0,484437 X$; onde Y = peso vivo (kg) e X = idade (dias); $R^2 = 98,53\%$. O percentual geral de desenvolvimento de PV dos potros, em relação ao esperado para machos adultos da raça Mangalarga Marchador (400 kg), foi de 44,2% aos 173 dias e de 68,1% aos 363 dias de idade. Esses valores foram semelhantes aos citados para equinos no Nutrients... (2007, 1989) e superiores ao observado por Rezende et al. (1986), os quais estudaram potros Mangalarga Marchador criados no mesmo haras onde foi realizado o presente estudo.

Na comparação das dietas, não houve diferença das médias dos ganhos diários de peso vivo (GDPV) dos animais durante o período experimental ($P > 0,05$), sendo as médias gerais observadas de: $0,69 \pm 0,17$ kg/dia aos 205 dias (30 dias após desmame); $0,70 \pm 0,23$ kg/dia aos 232 dias (60 dias após desmame); $0,44 \pm 0,14$ kg/dia aos 267 dias (90 dias após desmame); $0,37 \pm 0,14$ kg/dia aos 302 dias (120 dias após desmame); $0,44 \pm 0,13$ kg/dia aos 332 dias (150 dias após desmame) e $0,46 \pm 0,18$ kg/dia aos 363 dias de idade (180 dias após desmame). Esses valores foram semelhantes ao citado no Nutrients... (1989) para potros desmamados com crescimento rápido, de 0,70 kg/dia aos seis meses e de 0,50 kg/dia aos 12 meses de idade.

Conforme ilustrado na figura 2, os resultados de GDPV de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 3,0308 - 0,01647 X + 0,00002586 X^2$; onde Y = ganho de peso vivo (kg/dia) e X = idade (dias); $R^2 = 82,97\%$. A menor taxa de GDPV, segundo a equação de regressão, foi de 0,41 kg/dia aos 318 dias de idade.

O efeito negativo da deficiência nutricional da dieta sobre o desenvolvimento dos potros é mais acentuado sobre o ganho de peso (Hintz, 1992), seguido pelas medidas de circunferência e, finalmente, de altura (Ellis e Lawrence, 1978, citados por Rezende et al., 2000a). Como o período de menor GDPV coincidiu com cerca de 30 dias após o término do período seco na região norte de Minas Gerais (setembro), esse resultado sugeriu que mesmo os aditivos nutricionais estudados apresentando efeito benéfico sobre a fração fibrosa da dieta, conforme verificado por Moura et al. (2009, 2010), esses efeitos nutricionais não foram suficientes para impedir a redução na taxa de crescimento dos animais, em função da menor qualidade do volumoso no período mais seco da região (3,67% PB e 9,99% lignina; **vide** tabelas 1 e 2), que no ano de 2006 foram nos meses de maio a agosto (**vide** anexo – tabela 1). O Nutrients... (2007) salientou que na nutrição equina, assim como de qualquer outra espécie, a ênfase deve ser dada no fornecimento de dietas balanceadas, pois os aditivos nutricionais auxiliam, porém não substituem a base da alimentação animal. No caso de potros, o oferecimento de outras forragens com melhor qualidade nutricional, como, por exemplo, feno de leguminosas, provavelmente, teriam auxiliado no desenvolvimento contínuo dos animais nessa época do ano.

Tabela 5. Médias, desvios-padrão e percentuais de peso vivo, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Peso vivo em kg (% adulto ¹)					
173 ± 8 (desmame)	177,8 ± 19,6 (44,5)	165,5 ± 16,9 (41,4)	190,0 ± 16,1 (47,5)	173,0 ± 16,1 (43,3)	176,6 ± 18,0 (44,2)
205 ± 8	201,5 ± 22,8 (50,4)	188,5 ± 17,7 (47,1)	210,3 ± 15,9 (52,6)	196,3 ± 14,6 (49,1)	199,1 ± 18,1 (49,8)
232 ± 12	219,5 ± 27,7 (54,9)	208,3 ± 20,3 (52,1)	230,3 ± 18,5 (57,6)	210,3 ± 20,8 (52,6)	217,1 ± 21,7 (54,3)
267 ± 11	231,0 ± 27,4 (57,8)	224,5 ± 21,6 (56,1)	246,0 ± 17,6 (61,5)	227,8 ± 17,0 (57)	232,3 ± 20,9 (58,1)
302 ± 12	244,8 ± 30,4 (61,2)	235,3 ± 21,6 (58,8)	259,0 ± 18,8 (64,8)	240,8 ± 15,0 (60,2)	244,9 ± 21,8 (61,2)
332 ± 12	259,0 ± 29,4 (64,8)	248,8 ± 18,1 (62,2)	271,8 ± 17,9 (68)	253,8 ± 14,7 (63,5)	258,3 ± 20,6 (64,6)
363 ± 12	275,0 ± 25,6 (68,8)	263,0 ± 15,1 (65,8)	286,3 ± 16,3 (71,6)	265,3 ± 13,6 (66,3)	272,4 ± 18,9 (68,1)

¹Peso vivo adulto esperado para equinos machos da raça Mangalarga Marchador: 400 kg.

Equação de regressão: $Y = 99,0136 + 0,484437 X$; onde Y = peso vivo (kg) e X = idade (dias); $R^2 = 98,53\%$.

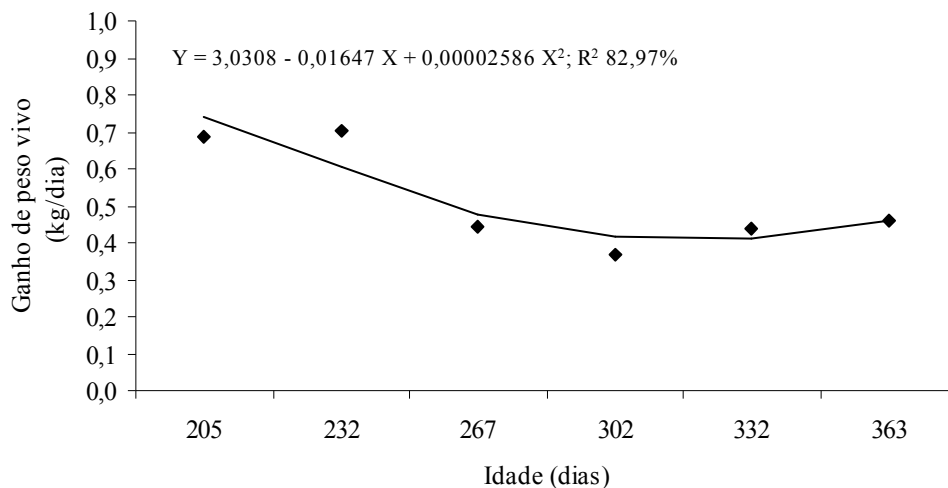


Figura 2. Ganho diário de peso vivo, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 31,64%.

Como Moura et al. (2010) observaram aumento na digestibilidade dos nutrientes da dieta, especialmente da fração fibrosa e dos minerais, dos potros do presente experimento aos 267 dias de idade, uma possível hipótese que pode ter influenciado para que os aditivos testados não tenham apresentado efeito benéfico sobre o GDPV seria a faixa etária estudada. Glade (1991a,b) avaliou os efeitos

da suplementação com *S. cerevisiae* em éguas no terço final de gestação e no início da lactação sobre a produção e composição do leite materno e sobre a taxa de crescimento dos seus respectivos potros nos primeiros 56 dias de idade. Os potros que eram filhos das éguas suplementadas tiveram maiores taxas de GDPV a partir dos 28 dias de idade, em função do aumento na produção quantitativa e qualitativa do leite de suas mães. Segundo Cabral et al. (2004b,c) e Rezende et al. (2000a,b), a taxa de desenvolvimento corporal dos equinos é mais acelerada no primeiro ano de vida, sendo que no primeiro mês pós-nascimento esse crescimento é ainda mais acelerado. Isto explicaria a divergência dos resultados do presente trabalho em relação ao trabalho de Glade (1991a,b), o qual observou efeito benéfico dos probióticos no GDPV de potros durante o período de aleitamento.

No entanto, mesmo com a pior qualidade do volumoso no período seco, os animais mantiveram escore corporal acima de 2 (Carrol e Huntington, 1988) durante todo período experimental e que não foi diferente entre dietas ($P>0,05$), conforme pode ser observado na tabela 6. Esse resultado sugeriu que a dieta formulada segundo recomendações propostas no Nutrients... (1989) foi satisfatória para manter a condição nutricional avaliada através do escore corporal dos potros Mangalarga Marchador criados nas condições brasileiras.

Tabela 6. Médias do escore corporal de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Escore corporal ¹					
173 ± 8 (desmame)	3,0	2,9	3,0	2,8	2,9
205 ± 8	3,1	3,0	2,9	3,0	3,0
232 ± 12	3,1	3,0	3,1	2,9	3,0
267 ± 11	3,0	3,3	3,3	3,1	3,2
302 ± 12	2,9	3,2	3,4	3,3	3,2
332 ± 12	3,1	3,1	3,1	3,2	3,1
363 ± 12	3,2	3,3	3,3	3,4	3,3

¹Carrol e Huntington (1988).

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste Kruskal-Wallis ($P>0,05$).

Com relação às medidas corporais dos potros alimentados com dietas suplementadas ou não com probióticos ou fitase, dos 173 dias (desmame) aos 363 dias de idade, os valores médios, desvios-padrão e percentuais em relação à idade adulta estão representados nas tabelas 7 (altura na cernelha), 8 (altura na garupa), 9 (comprimento corporal), 10 (altura no costado), 11 (perímetro torácico) e 12 (perímetro de canela). Esses resultados se ajustaram significativamente em relação ao tempo (idade em dias) com modelos de regressão linear que estão descritos nas tabelas acima citadas. Os potros Mangalarga Marchador estudados apresentaram uma taxa de crescimento de 0,07 cm/dia de altura na cernelha e na garupa; 0,11 cm/dia de comprimento corporal; 0,03 cm/dia de altura no costado; 0,09 cm/dia de perímetro torácico e 0,01 cm/dia de perímetro de canela.

Os valores gerais médios de altura na cernelha, altura na garupa e comprimento corporal dos animais foram, respectivamente: 121,5±3,7; 125,4±3,2 e 115,0±4,7 cm aos 173 dias de idade e 135,0±3,2; 138,1±2,9 e 135,4±3,8 cm aos 363 dias de idade (**vide** tabela 7, 8 e 9). Esses valores foram semelhantes aos observados por Cabral et al. (2004b), os quais acompanharam o desenvolvimento de potros machos Mangalarga Marchador pertencentes a criatórios localizados na região Serrana e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro; e por Rezende et al. (2000a) e Rezende et al. (1986), os quais estudaram potros Mangalarga Marchador pertencentes ao mesmo haras onde foi desenvolvido o presente trabalho, localizado na região norte do Estado de Minas Gerais.

Os potros apresentaram médias gerais de altura no costado, perímetro torácico e perímetro de canela de: 47,5±2,1; 130,1±4,9; 17,1±0,5 cm aos 173 dias; e 54,2±1,6; 149,3±3,7; 18,9±0,5

cm aos 363 dias de idade, respectivamente (**vide** tabela 10, 11 e 12). Rezende et al. (1986) observaram valores médios de 58 cm para altura no costado de potros Mangalarga Marchador aos 12,7 meses de idade, superando os valores encontrados para animais de mesmo sexo, idade e raça no presente estudo e por Cabral et al. (2004b), os quais observaram médias de 54,3±2,1 cm.

A região torácica, avaliada através da altura no costado e do perímetro torácico, é importante para um bom rendimento na atividade atlética desempenhada pelo equino, por proporcionar adequada inserção dos músculos dos membros torácicos e por alojar e servir de proteção para os órgãos vitais: coração e pulmões (Cabral et al., 2004b; Rezende et al., 2000a). Rezende et al. (2000a) estudaram os efeitos de dois programas nutricionais sobre o desenvolvimento corporal de potros Mangalarga Marchador, concluindo que apesar dos animais não suplementados no *creeper* conseguirem compensar sua altura na cernelha após o início do fornecimento de concentrado no desmame (166 dias de idade), eles apresentaram menor perímetro torácico aos 12 meses quando comparados com os animais em período de aleitamento que receberam concentrado balanceado acrescido de minerais (*creep feeding*) dos 3 aos 6 meses de idade. Portanto, uma estratégia para se obter os efeitos benéficos esperados com os aditivos nutricionais testados sobre o arqueamento torácico de potros seria sua inclusão no *creep feeding*. Nesta faixa etária os potros apresentam maior desenvolvimento corporal (Santos et al., 2005; Cabral et al., 2004b; Rezende et al., 2000a) e nos animais do presente experimento estes efeitos, provavelmente, não aconteceram em virtude do período de avaliação dos potros, dos 173 aos 363 dias de idade, possuir uma taxa de crescimento menor em relação aos primeiros seis meses de vida.

As médias de perímetro de canela dos potros suplementados ou não com probióticos ou fitase exógena (**vide** tabela 12) foram superiores às verificadas em potros machos Mangalarga Marchador com seis (16,1 cm) e 12 meses (17,3 cm) por Cabral et al. (2004b) e de 14,68 aos 6 meses e 16,73 cm aos 12 meses por Rezende et al. (2000a). Essas divergências podem ter ocorrido em função das diferenças nas dietas utilizadas em cada trabalho e/ou pelo local de mensuração dessa medida corporal. No presente experimento a mensuração do perímetro de canela foi realizada segundo Camargo e Chieffi (1971), onde é medida a circunferência da canela logo abaixo do joelho, e nos trabalhos citados a medida de perímetro foi aferida no meio da canela.

Gonçalves et al. (2009) caracterizaram morfometricamente equinos machos adultos Mangalarga Marchador pertencentes ao haras onde foi realizado o presente trabalho, localizado na região de Montes Claros-MG, os quais apresentaram medidas lineares enquadradas no padrão da raça: 148,3±0,04 de altura na cernelha; 147,3±0,04 de altura na garupa; 149,7±0,04 de comprimento corporal; 172,3±0,06 de perímetro torácico e 18,0±0,01 de perímetro de canela. Considerando-se esses valores para calcular o percentual de crescimento dos potros do presente experimento em relação ao esperado quando adulto, os animais apresentaram percentual de crescimento aos 173 e 363 dias de: 81,9% e 91,0% para altura na cernelha; 85,1% e 93,8% para altura na garupa; 76,8% e 90,4% para comprimento corporal; 75,5% e 86,7% para perímetro torácico; 95,0% e 105,0% para perímetro de canela (**vide** tabelas 7 a 12). Verifica-se, portanto, que o desenvolvimento corporal dos potros no presente trabalho concordou com o esperado para essa faixa etária, pois foi semelhante aos observados por Rezende et al. (2000a) e Cabral et al. (2004b), os quais acompanharam o desenvolvimento de potros desmamados da mesma raça nacional.

Na comparação das médias dos ganhos mensais das seis medidas corporais estudadas, não houve diferença no desenvolvimento corporal dos potros alimentados com dietas suplementadas ou não com probióticos ou fitase exógena ou interação entre eles ($P>0,05$).

Com exceção dos ganhos mensais de altura na cernelha (GAC) e perímetro de canela (GPC), os resultados de todos os potros para ganhos mensais de altura na garupa (GAG), de comprimento corporal (GCC), de altura no costado (GACo) e de perímetro torácico (GPT) se ajustaram significativamente aos modelos matemáticos de regressão (**vide** figuras 3 a 8).

Os resultados de GAG de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 4): $Y = -0,7291 + 0,02892 X - 0,00006423 X^2$; onde Y = ganho de altura na garupa (cm/mês) e X = idade (dias); R^2 91,33%. A maior taxa de GAG, segundo a equação de regressão, foi de 2,53 cm/mês aos 225 dias de idade. Conforme ilustrado na figura 5, os resultados de GCC de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 6,9752 - 0,012605 X$; onde Y = ganho de comprimento corporal (cm/mês) e X = idade (dias); R^2 69,11%. Os resultados de GACo de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 6): $Y = 2,5241 - 0,004926 X$; onde Y = ganho de altura no costado (cm/mês) e X = idade (dias); R^2 67,67%. O GCC e GACo dos potros Mangalarga

Marchador estudados apresentaram uma redução na taxa de crescimento de -0,012605 cm e de -0,0049 cm ao mês, respectivamente, justificado pelo aumento da idade dos animais.

Conforme ilustrado na figura 7, os resultados de GPT de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 39,6238 - 0,241526 X + 0,00038426 X^2$; ; onde Y = ganho de perímetro torácico (cm/mês) e X = idade (dias); R^2 96,48%. A menor taxa de GPT, segundo a equação de regressão, foi de 1,67 cm/mês aos 314 dias de idade, concordando com a menor taxa de GDPV no mesmo período (0,41 kg/dia aos 318 dias de idade) e suas respectivas considerações feitas anteriormente.

Novamente a faixa etária estudada provavelmente limitou a avaliação dos possíveis efeitos indiretos dos probióticos ou fitase exógena sobre o desenvolvimento corporal de potros criados nas condições brasileiras, pois Glade (1991a,b) verificou efeito indireto dos probióticos sobre o crescimento em altura na cernelha de potros filhos de éguas suplementadas com *S. cerevisiae*, os quais apresentaram valores superiores ao grupo controle dos 42 aos 56 dias de idade.

Infelizmente a escassez de pesquisas publicadas sobre avaliação dos possíveis efeitos indiretos dos probióticos ou fitase exógena sobre o desenvolvimento corporal de equinos limitou a discussão dos resultados encontrados no presente experimento. Além da faixa etária, outras possíveis hipóteses que deveriam ser consideradas como fatores que interferem na observação dos possíveis benefícios esperados com a utilização de um aditivo probiótico seriam a utilização de microorganismos espécie-específicos (Yuyama et al., 2004) e a dose utilizada na suplementação da dieta fornecida aos animais, especialmente uma concentração mínima viável acima de $7 \log_{10}$ ufc/g para cada microorganismo presente no produto (Martins et al., 2008a,b; Saad, 2006; Vanbelle et al., 1990). Com relação à fitase exógena, a concentração de Ca dietético, bem como a relação Ca:P da dieta, interferem negativamente no potencial catalítico da enzima, sendo importante a realização de trabalhos onde a dieta seja balanceada de acordo com a quantidade esperada de P fítico liberado pelo aditivo enzimático, concordando com a afirmação de Dunnett et al. (2009).

Tabela 7. Médias, desvios-padrão e percentuais de altura na cernelha, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Altura na cernelha em cm (% adulto ¹)					
173 ± 8 (desmame)	121,4 ± 3,6 (81,9)	118,6 ± 3,3 (80,0)	123,9 ± 3,1 (83,5)	119,0 ± 3,5 (80,2)	121,5 ± 3,7 (81,9)
205 ± 8	123,5 ± 2,9 (83,3)	121,9 ± 3,2 (82,2)	126,0 ± 2,8 (85,0)	122,9 ± 2,5 (82,9)	123,9 ± 3,3 (83,5)
232 ± 12	125,5 ± 3,2 (84,6)	124,6 ± 3,7 (84,0)	128,4 ± 2,3 (86,6)	124,9 ± 2,6 (84,2)	126,3 ± 3,6 (85,2)
267 ± 11	128,1 ± 2,8 (86,4)	127,6 ± 3,7 (86,0)	131,3 ± 2,2 (88,5)	128,3 ± 2,5 (86,5)	129,2 ± 3,5 (87,1)
302 ± 12	131,3 ± 3,8 (88,5)	129,9 ± 3,4 (87,6)	133,9 ± 2,7 (90,3)	130,5 ± 2,9 (88,0)	131,8 ± 3,6 (88,9)
332 ± 12	132,4 ± 3,5 (89,3)	131,3 ± 3,1 (88,5)	135,4 ± 2,7 (91,3)	132,0 ± 2,7 (89,0)	133,2 ± 3,5 (89,8)
363 ± 12	134,3 ± 2,6 (90,6)	133,6 ± 3,5 (90,1)	136,6 ± 2,4 (92,1)	134,4 ± 3,6 (90,6)	135,0 ± 3,2 (91,0)

¹Altura na cernelha de equinos machos adultos da raça Mangalarga Marchador criados na região de Montes Claros/MG: 148,3 ± 0,04 cm (Gonçalves et al., 2009).

Equação de regressão: $Y = 109,375 + 0,07227 X$; onde Y = altura na cernelha (cm) e X = idade (dias); $R^2 = 99,15\%$.

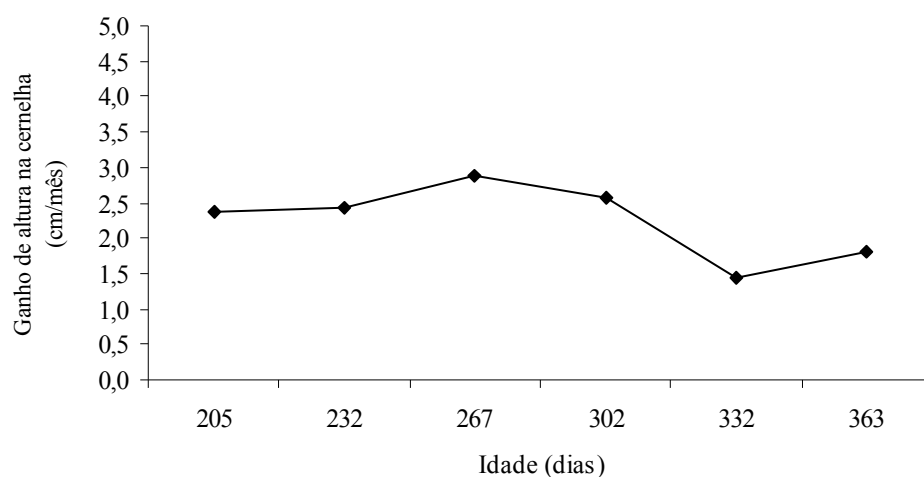


Figura 3. Ganho mensal de altura na cernelha, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 30,90%.

O resultado de ganho mensal de altura na cernelha em relação ao tempo (dias) não se ajustou significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão.

Tabela 8. Médias, desvios-padrão e percentuais de altura na garupa, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Altura na garupa em cm (% adulto ¹)					
173 ± 8 (desmame)	125,3 ± 3,0 (85,1)	123,4 ± 3,0 (83,8)	127,1 ± 2,9 (86,3)	126,0 ± 3,8 (85,5)	125,4 ± 3,2 (85,1)
205 ± 8	127,5 ± 3,6 (86,6)	126,3 ± 3,0 (85,7)	129,3 ± 2,9 (87,8)	128,5 ± 3,3 (87,2)	127,9 ± 3,1 (86,8)
232 ± 12	130,3 ± 3,6 (88,5)	128,5 ± 3,4 (87,2)	131,9 ± 1,9 (89,5)	131,0 ± 4,2 (88,9)	130,4 ± 3,3 (88,5)
267 ± 11	132,3 ± 3,0 (89,8)	131,3 ± 3,1 (89,1)	134,6 ± 1,8 (91,4)	134,0 ± 3,9 (91,0)	133,0 ± 3,0 (90,3)
302 ± 12	134,5 ± 4,5 (91,3)	133,6 ± 2,9 (90,7)	136,8 ± 2,5 (92,9)	135,5 ± 3,7 (92,0)	135,1 ± 3,3 (91,7)
332 ± 12	136,4 ± 3,1 (92,6)	134,9 ± 3,1 (91,6)	138,3 ± 1,9 (93,9)	137,3 ± 3,7 (93,2)	136,7 ± 3,0 (92,8)
363 ± 12	137,4 ± 2,6 (93,3)	136,5 ± 3,0 (92,7)	139,6 ± 2,5 (94,8)	139,0 ± 3,6 (94,4)	138,1 ± 2,9 (93,8)

¹Altura na garupa de equinos machos adultos da raça Mangalarga Marchador criados na região de Montes Claros/MG: 147,3 ± 0,04 cm (Gonçalves et al., 2009).

Equação de regressão: $Y = 114,305 + 0,06753 X$; onde Y = altura na garupa (cm) e X = idade (dias); $R^2 = 98,68\%$.

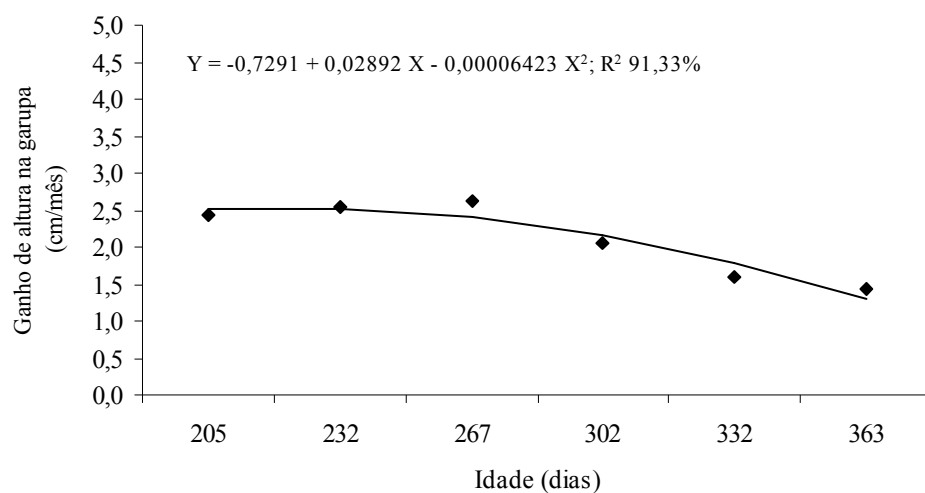


Figura 4. Ganho mensal de altura na garupa, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 19,27%.

Tabela 9. Médias, desvios-padrão e percentuais de comprimento corporal, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Comprimento corporal em cm (% adulto ¹)					
173 ± 8 (desmame)	114,6 ± 6,0 (76,6)	113,4 ± 2,6 (75,8)	117,4 ± 5,6 (78,4)	114,5 ± 4,7 (76,5)	115,0 ± 4,7 (76,8)
205 ± 8	118,0 ± 4,0 (78,8)	116,5 ± 2,0 (77,8)	121,9 ± 4,4 (81,4)	119,8 ± 4,0 (80,0)	119,0 ± 3,9 (79,5)
232 ± 12	123,8 ± 5,7 (82,7)	122,0 ± 3,8 (81,5)	125,5 ± 5,1 (83,8)	123,3 ± 2,8 (82,4)	123,6 ± 4,2 (82,6)
267 ± 11	128,0 ± 4,7 (85,5)	126,0 ± 3,7 (84,2)	129,9 ± 4,3 (86,8)	126,0 ± 3,9 (84,2)	127,5 ± 4,1 (85,2)
302 ± 12	130,3 ± 6,0 (87,0)	127,9 ± 3,6 (85,4)	131,9 ± 3,7 (88,1)	129,1 ± 4,1 (86,2)	129,8 ± 4,2 (86,7)
332 ± 12	132,8 ± 4,4 (88,7)	131,3 ± 3,7 (87,7)	135,1 ± 4,5 (90,2)	132,4 ± 2,0 (88,4)	132,9 ± 3,7 (88,8)
363 ± 12	135,3 ± 5,8 (90,4)	133,4 ± 2,7 (89,1)	137,5 ± 4,1 (91,9)	135,4 ± 1,3 (90,4)	135,4 ± 3,8 (90,4)

¹Comprimento corporal de equinos machos adultos da raça Mangalarga Marchador criados na região de Montes Claros/MG: 149,7 ± 0,04 cm (Gonçalves et al., 2009).

Equação de regressão: $Y = 97,7318 + 0,106213 X$; onde Y = comprimento corporal (cm) e X = idade (dias); $R^2 = 98,16$.

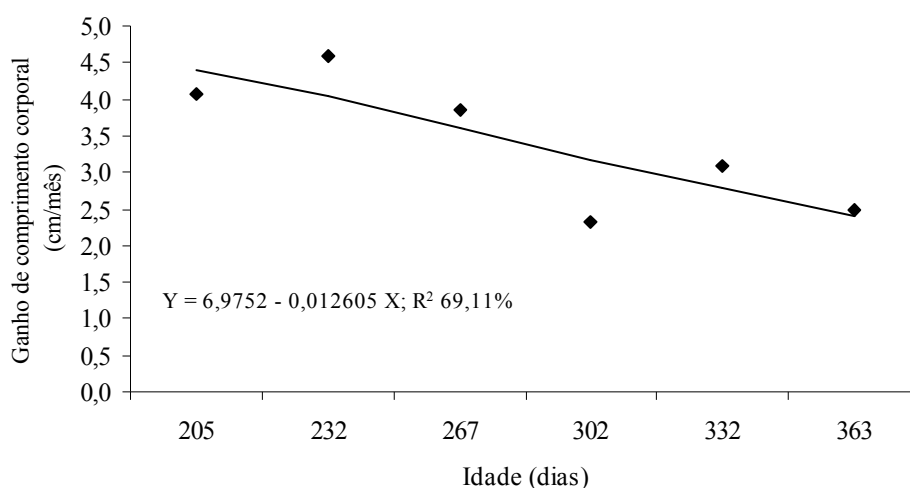


Figura 5. Ganho mensal de comprimento corporal, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 34,68%.

Tabela 10. Médias, desvios-padrão de altura no costado de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Altura no costado em cm					
173 ± 8 (desmame)	47,8 ± 3,1	46,6 ± 1,8	48,1 ± 1,3	47,3 ± 2,3	47,5 ± 2,1
205 ± 8	49,1 ± 2,6	48,1 ± 1,8	50,8 ± 0,9	48,1 ± 1,4	49,0 ± 1,9
232 ± 12	50,3 ± 3,3	49,1 ± 2,4	51,9 ± 0,9	49,8 ± 1,3	50,3 ± 2,2
267 ± 11	51,4 ± 2,2	50,4 ± 1,3	53,3 ± 0,9	52,0 ± 1,2	51,8 ± 1,7
302 ± 12	51,9 ± 3,0	51,6 ± 1,8	54,3 ± 0,6	52,6 ± 0,9	52,6 ± 1,9
332 ± 12	53,3 ± 2,1	52,1 ± 1,8	55,1 ± 0,5	52,8 ± 1,0	53,3 ± 1,8
363 ± 12	54,3 ± 1,9	53,4 ± 1,7	55,6 ± 0,6	53,6 ± 1,5	54,2 ± 1,6

Equação de regressão: $Y = 41,8868 + 0,03491 X$; onde Y = altura no costado (cm) e X = idade (dias); $R^2 = 97,81\%$.

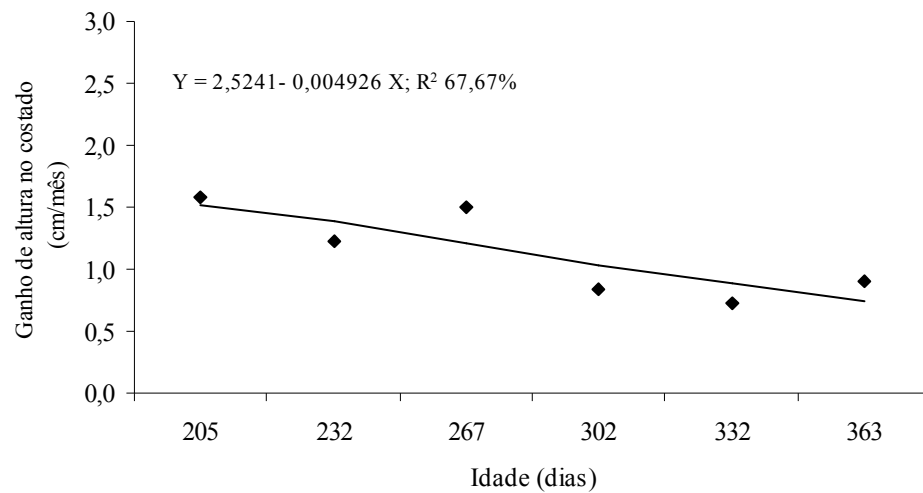


Figura 6. Ganho mensal de altura no costado, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 41,51%.

Tabela 11. Médias, desvios-padrão e percentuais de perímetro torácico, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Perímetro torácico em cm (% adulto ¹)					
173 ± 8 (desmame)	130,5 ± 3,8 (75,7)	127,1 ± 3,6 (73,8)	133,4 ± 5,1 (77,4)	129,3 ± 6,1 (75,0)	130,1 ± 4,9 (75,5)
205 ± 8	136,5 ± 4,8 (79,2)	133,9 ± 6,0 (77,7)	140,4 ± 3,9 (81,5)	135,9 ± 4,9 (78,9)	136,7 ± 5,1 (79,3)
232 ± 12	140,7 ± 6,2 (81,7)	136,8 ± 5,5 (79,4)	145,7 ± 2,9 (84,6)	138,8 ± 5,1 (80,6)	140,5 ± 5,7 (81,5)
267 ± 11	141,8 ± 6,5 (82,3)	141,2 ± 6,8 (82,0)	146,8 ± 2,4 (85,2)	142,1 ± 3,8 (82,5)	143,0 ± 5,2 (83,0)
302 ± 12	144,7 ± 7,8 (84,0)	143,0 ± 5,4 (83,0)	147,6 ± 1,9 (85,7)	143,8 ± 2,9 (83,5)	144,7 ± 4,9 (84,0)
332 ± 12	147,7 ± 5,3 (85,7)	145,2 ± 4,2 (84,3)	149,5 ± 2,1 (86,8)	145,6 ± 4,0 (84,5)	147,0 ± 4,0 (85,3)
363 ± 12	150,6 ± 4,0 (87,4)	147,3 ± 4,9 (85,5)	151,4 ± 2,3 (87,9)	147,9 ± 2,2 (85,8)	149,3 ± 3,7 (86,7)

¹Perímetro torácico de equinos machos adultos da raça Mangalarga Marchador criados na região de Montes Claros/MG: 172,3 ± 0,06 cm (Gonçalves et al., 2009).

Equação de regressão: $Y = 117,006 + 0,0918974 X$; onde Y = perímetro torácico (cm) e X = idade (dias); $R^2 = 93,36$.

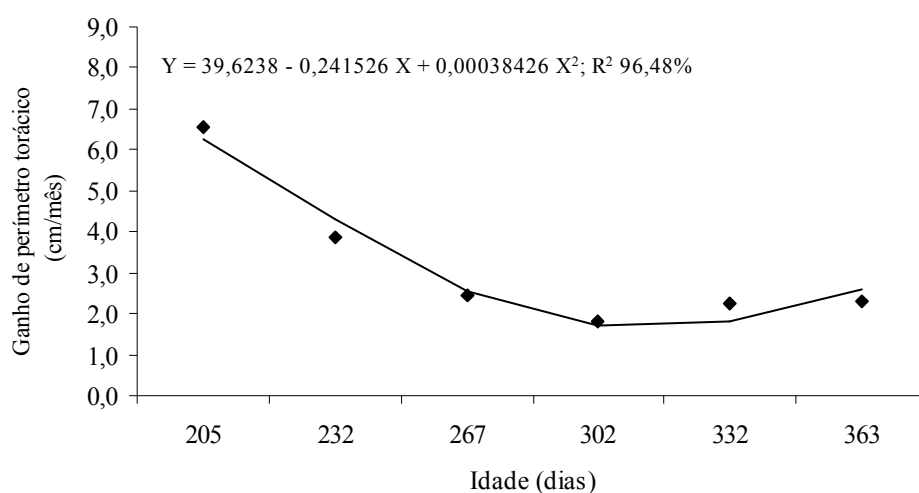


Figura 7. Ganho mensal de perímetro torácico, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 40,07%.

Tabela 12. Médias, desvios-padrão e percentuais de perímetro de canela, em relação ao adulto, de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média geral
Perímetro de canela em cm (% adulto ¹)					
173 ± 8 (desmame)	17,4 ± 0,5 (96,7)	16,7 ± 0,6 (92,8)	17,4 ± 0,3 (96,7)	17,0 ± 0,5 (94,4)	17,1 ± 0,5 (95,0)
205 ± 8	17,6 ± 0,6 (97,8)	17,0 ± 0,6 (94,4)	17,8 ± 0,5 (98,9)	17,2 ± 0,7 (95,6)	17,4 ± 0,6 (96,7)
232 ± 12	17,9 ± 0,6 (99,4)	17,3 ± 0,5 (96,1)	18,1 ± 0,4 (100,6)	17,7 ± 0,3 (98,3)	17,7 ± 0,5 (98,3)
267 ± 11	18,2 ± 0,4 (101,1)	18,0 ± 0,6 (100,0)	18,5 ± 0,1 (102,8)	18,1 ± 0,3 (100,6)	18,2 ± 0,4 (101,1)
302 ± 12	18,4 ± 0,4 (102,2)	18,3 ± 0,8 (101,7)	18,8 ± 0,3 (104,4)	18,5 ± 0,4 (102,8)	18,5 ± 0,5 (102,8)
332 ± 12	18,5 ± 0,4 (102,8)	18,5 ± 0,8 (102,8)	19,1 ± 0,2 (106,1)	18,7 ± 0,3 (103,9)	18,7 ± 0,5 (103,9)
363 ± 12	18,9 ± 0,4 (105,0)	18,7 ± 0,9 (103,9)	19,2 ± 0,3 (106,6)	18,9 ± 0,4 (105,0)	18,9 ± 0,5 (105,0)

¹Perímetro de canela de equinos machos adultos da raça Mangalarga Marchador criados na região de Montes Claros/MG: 18,0 ± 0,01 cm (Gonçalves et al., 2009).

Equação de regressão: $Y = 15,4305 + 0,00984063 X$; onde Y = perímetro de canela (cm) e X = idade (dias); $R^2 = 98,47\%$.

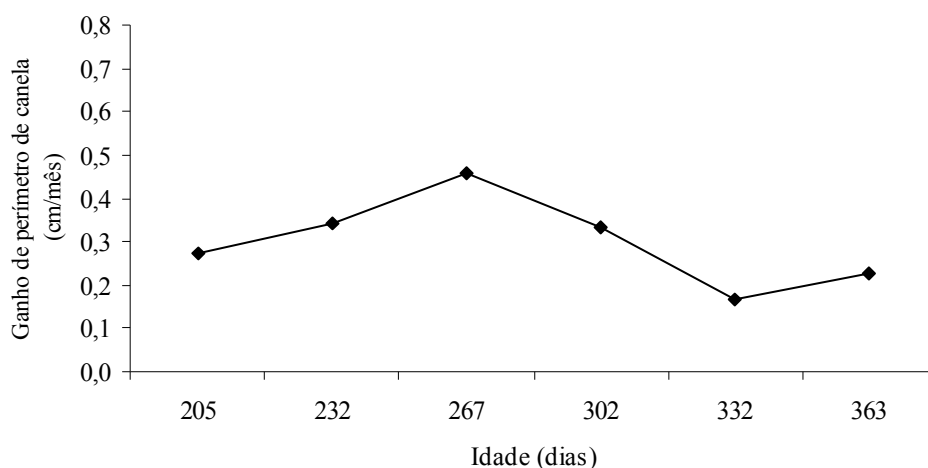


Figura 8. Ganho mensal de perímetro de canela, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 71,15%.

O resultado de ganho mensal de perímetro de canela em relação ao tempo (dias) não se ajustou significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão.

As médias de índice corporal (IC), índice dáctilo-torácico (IDT) e índice de carga de canela (ICC) avaliados nos potros durante o período experimental também não foram influenciadas pelas dietas testadas ($P>0,05$).

De acordo com os valores médios observados para IC, os potros do presente trabalho foram classificados como mediolíneos aos 173 dias ($88,40\pm 2,80$), 205 dias ($87,14\pm 2,06$) e 232 dias de idade ($88,02\pm 2,20$); e como longelíneos aos 332 dias ($90,42\pm 1,79$) e 363 dias de idade ($90,7\pm 1,88$). O IC aos 267 dias ($89,21\pm 2,28$) e aos 302 dias de idade ($89,69\pm 2,13$) foi considerado intermediário entre os dois biotipos funcionais. Conforme ilustrado na figura 9, esses resultados se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 84,5354 + 0,016993 X$; onde Y = índice corporal e X = idade (dias); R^2 81,28%. O IC dos potros Mangalarga Marchador estudados apresentou uma taxa de aumento de 0,017 ao mês.

Como o IC esperado em equinos adultos da raça Mangalarga Marchador é mediolíneo (valores entre 86 e 88; Bortoni, 1991), a tendência de aumento desse índice de conformação nesse período de desenvolvimento corporal dos animais pode estar relacionado à taxa de crescimento ligeiramente maior do comprimento corporal em relação ao perímetro torácico (0,1062 cm/dia vs. 0,09189 cm/dia).

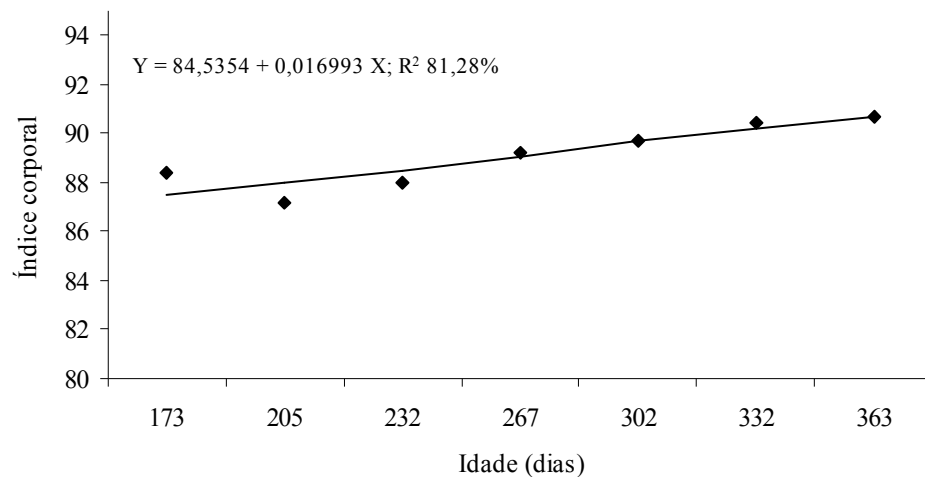


Figura 9. Índice corporal, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P>0,05$); CV = 5,29%.

O IDT dos potros suplementados ou não com probióticos ou fitase foi: $13,15\pm 0,24$ aos 173 dias; $12,72\pm 0,30$ aos 205 dias; $12,62\pm 0,35$ aos 232 dias; $12,72\pm 0,28$ aos 267 dias; $12,79\pm 0,36$ aos 302 dias; $12,71\pm 0,31$ aos 322 dias e $12,66\pm 0,30$ aos 363 dias de idade. De acordo com esses resultados, os potros apresentaram proporções corporais encontradas em animais destinados à tração durante todo período avaliado (valores acima de 10,8). Cabral et al. (2004c) observaram que os potros Mangalarga Marchador, segundo esse índice de conformação, são animais hiperométricos dos seis aos 12 meses de idade e com relação ao sistema eclético de proporções lineares proposto por Lesbre (1920), citado por Ribeiro (1993), os potros nascem com as proporções maiores de altura na cernelha e altura na garupa e menor de comprimento corporal em relação ao observado na fase adulta, mas à medida que eles crescem, essas proporções tendem a se aproximar do esperado no animal adulto. Essa afirmação concorda com crescimento das medidas corporais nos potros Mangalarga Marchador estudados, onde a taxa de crescimento do comprimento corporal (0,11 cm/dia) foi superior a de altura na cernelha e na garupa (0,07 cm/dia).

Os resultados de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 10): $Y = 24,7529 - 0,134072 X + 0,000486532 X^2 - 0,000000576 X^3$; onde Y = índice dáctilo-torácico e X = idade (dias); R^2 94,05%. O menor e maior valores de IDT, segundo a equação de regressão, foram: 12,64 aos 240 dias e 12,80 aos 323 dias de idade, respectivamente.

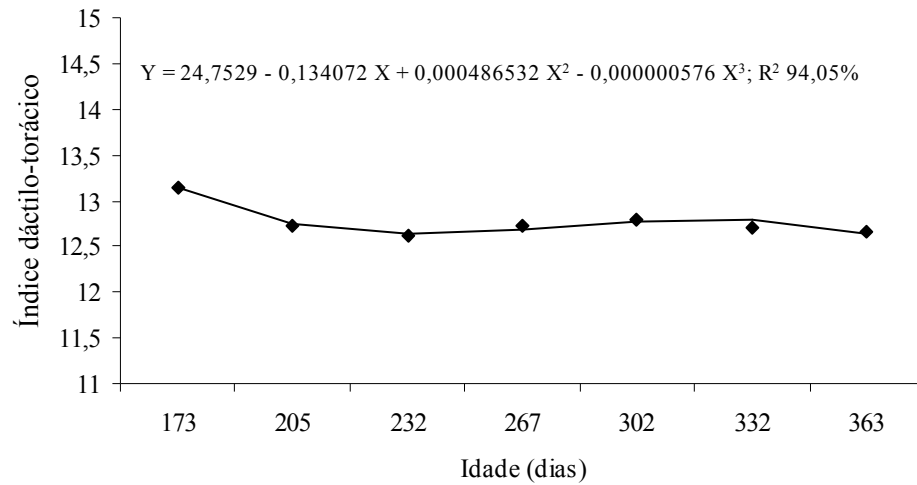


Figura 10. Índice dáctilo-torácico, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 4,79%.

O ICC dos potros suplementados ou não com probióticos ou fitase foi: $9,76 \pm 0,8$ aos 173 dias; $8,77 \pm 0,5$ aos 205 dias; $8,22 \pm 0,6$ aos 232 dias; $7,87 \pm 0,6$ aos 267 dias; $7,60 \pm 0,6$ aos 302 dias; $7,26 \pm 0,5$ aos 322 dias e $6,96 \pm 0,4$ aos 363 dias de idade. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Cabral et al. (2004c) em potros Mangalarga Marchador, com exceção do valor observado aos seis meses de idade (8,41). Essas diferenças podem ter ocorrido em função do manejo nutricional ou da composição genotípica dos animais. O experimento desses autores foi conduzido em criatórios da raça Mangalarga Marchador localizados na região Serrana e Metropolitana do estado do Rio de Janeiro, sendo utilizados 98 potros (55 machos e 43 fêmeas), filhos de 14 garanhões diferentes e representantes das mais diversas linhagens da raça Mangalarga Marchador. Com exceção de um haras que forneceu feno de alfafa para os potros antes do desmame, nenhum haras adotou *creep feeding* e após o desmame os animais receberam capim elefante picado *ad libitum* e ração comercial (aproximadamente 1 kg/dia).

Conforme ilustrado na figura 11, os resultados do ICC de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 11,6472 - 0,013391 X$; onde Y = índice de carga de canela e X = idade (dias); R^2 93,05%. Esse índice de conformação dos potros Mangalarga Marchador estudados apresentou uma taxa de decréscimo de -0,013 ao dia, justificado pela maior taxa de crescimento de ganho de peso quando comparado ao perímetro de canela (0,4844 kg/dia vs. 0,0098 cm/dia).

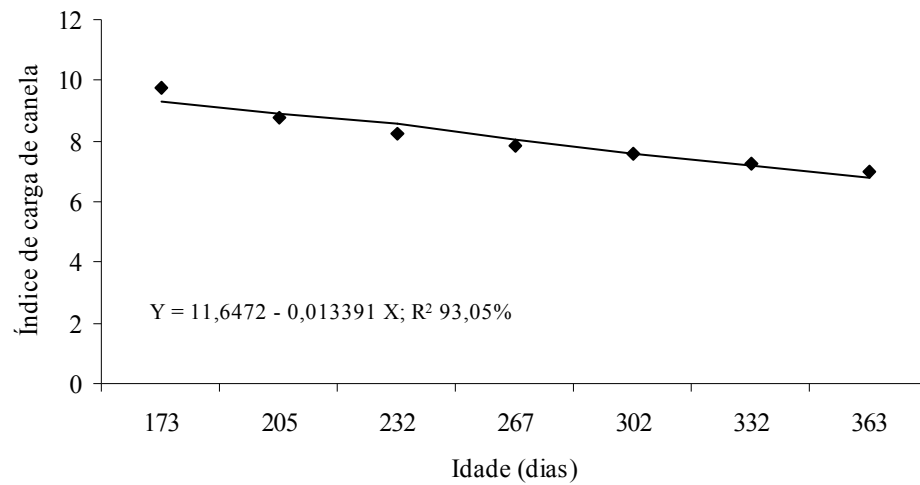


Figura 11. Índice de carga de canela, em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 3,15%.

2.3.2 Parâmetros sanguíneos dos potros desmamados Mangalarga Marchador

Na comparação das dietas, não houve diferença das concentrações séricas de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) dos potros Mangalarga Marchador estudados ($P > 0,05$). As médias gerais observadas durante todo período experimental estão representadas na tabela 13 e foram semelhantes ao encontrado por diversos autores (**vide** anexo – tabela 10). Houve diferenças na comparação das médias entre meses de avaliação ($P < 0,05$), sendo as concentrações de Ca sérico maiores aos 232 dias de idade (11,6 mg/dL). Isso sugeriu que houve melhoria no consumo mineral pelos potros após instituição da dieta experimental, pois previamente ao desmame os potros eram mantidos em sistema extensivo de criação e recebiam apenas suplementação mineral em cochos.

Tabela 13. Concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Cálcio	Fósforo	Magnésio
Concentração sérica (mg/dL)			
173 ± 8 (desmame)	10,0c	6,3a	2,6a
205 ± 8	10,3bc	6,1a	2,2ab
232 ± 12	11,6a	5,8ab	2,4a
267 ± 11	11,3ab	5,9ab	1,8b
302 ± 12	10,5bc	5,5ab	1,9b
332 ± 12	10,5bc	5,3bc	1,9b
363 ± 12	10,5bc	4,7c	1,9b

CV = 10,6% (cálcio); 14,88% (fósforo); 34,93% (magnésio).

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$).

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Moura et al. (2010), ao estudarem os mesmos potros do presente trabalho aos 269 dias de idade, observaram melhoria na disponibilidade aparente de Ca nos animais suplementados com probiótico de leveduras (grupo **B**) e na disponibilidade aparente de Ca e P nos animais suplementados com bactérias e leveduras (grupo **C**), no entanto esse benefício não influenciou nos valores séricos desses minerais no mesmo período. Esses resultados concordaram com Kim et al. (1991), os quais também não encontraram alterações nas concentrações séricas desses minerais, apesar do aumento na disponibilidade do P da dieta de equinos suplementados com probiótico de leveduras.

Os resultados observados para Ca sérico não se ajustaram significativamente a nenhum modelo matemático de regressão polinomial, mas os resultados do P sérico de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 12): $Y = 7,63595 - 0,00740348 X$; onde $Y = P$ sérico (mg/dL) e $X =$ idade (dias); R^2 91,07%. A concentração sérica desse mineral apresentou uma taxa de decréscimo de -0,0074 mg/dL ao dia.

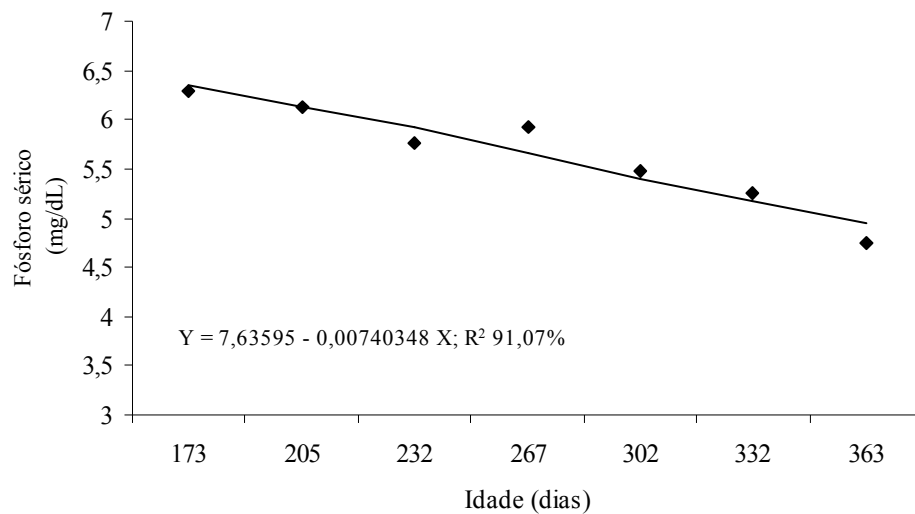


Figura 12. Concentração sérica de fósforo (mg/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase. Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 14,88%.

As concentrações de Mg sérico de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase foram menores dos 267 aos 363 dias de idade (1,8-1,9 mg/dL) quando comparadas com o período anterior (**vide** tabela 13). Esses valores ficaram abaixo do preconizado por Kaneko et al. (2008), de 2,2 a 2,8 mg/dL, porém foram maiores do que os encontrados por Rezende (1997) em potros Mangalarga Marchador dos 166 aos 301 dias de idade (1,4 mg/dL). Os resultados do Mg sérico de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 13): $Y = 4,90056 - 0,0179884 X + 0,0000266019 X^2$; onde $Y = Mg$ sérico (mg/dL) e $X =$ idade (dias); R^2 79,72%. A menor concentração de magnésio sérico, segundo a equação de regressão, foi de 1,86 mg/dL aos 338 dias de idade.

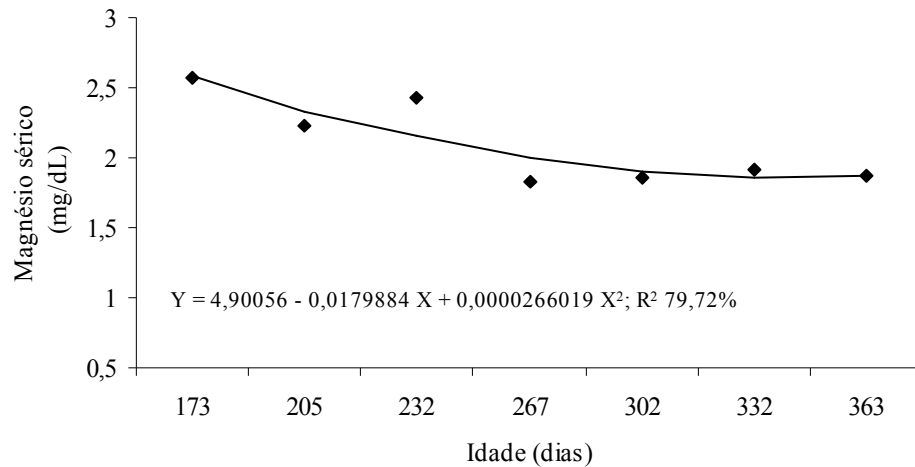


Figura 13. Concentração sérica de magnésio (mg/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 34,93%.

Segundo o Nutrients... (2007) e Lewis (2000), os valores séricos de minerais são de pequeno valor para um diagnóstico conclusivo de deficiência mineral, sendo mais interessante realizar a avaliação do histórico da dieta. Como os potros foram mantidos em sistema de pastejo contínuo, está representado na tabela 14 a quantidade diária de Ca, P e Mg consumidos apenas por meio da ingestão do concentrado e sal mineral. Percebe-se que o consumo diário de minerais foi bastante superior ao recomendado no Nutrients... (2007): 30,9 e 30,1 g/dia de Ca; 17,2 e 16,7 g/dia de P; 4,3 e 3,3 g/dia de Mg para potros aos seis e 12 meses de idade, respectivamente.

Tabela 14. Quantidade diária de cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) consumidos através do concentrado e sal mineral fornecidos aos potros

Idade (dias)	Ca do concentrado	Ca do sal mineral	Ca total	P do concentrado	P do sal mineral	P total	Mg do concentrado	Mg do sal mineral	Mg total
Consumo (g/dia)									
173 ± 8 (desmame)	29,82	3,19	33,01	24,57	1,25	25,82	7,77	0,95	8,72
205 ± 8	34,08	6,49	40,57	28,08	2,53	30,61	8,88	1,94	10,82
232 ± 12	36,92	6,61	43,53	30,42	2,58	33,00	9,62	1,98	11,6,0
267 ± 11	39,76	4,17	43,93	32,76	1,63	34,39	10,36	1,25	11,61
302 ± 12	41,18	4,85	46,03	33,93	1,89	35,82	10,73	1,45	12,18
332 ± 12	44,02	4,27	48,29	36,27	1,67	37,94	11,47	1,28	12,75
363 ± 12	46,86	2,71	49,57	38,61	1,06	39,67	12,21	0,81	13,02

Devido às relações existentes entre os minerais, os quais podem influenciar na absorção, metabolismo e/ou excreção um dos outros, a tendência de redução do P sérico durante o período experimental e os menores valores de Mg sérico observados nos potros dos 267 aos 363 dias de idade, provavelmente, podem ter acontecido em função de ação antagonista do Ca na absorção daqueles minerais. Para confirmação dessa hipótese, seria interessante a realização de outros exames complementares para melhor avaliação da homeostase de minerais em equinos, tais como clearance fracional de P urinário, dosagem de paratormônio e hormônios da tireóide.

As fitases exógenas são mundialmente usadas como estratégia nutricional para redução dos efeitos negativos do ácido fítico, permitindo a diminuição da inclusão de fontes inorgânicas de P na dieta de animais não ruminantes. Diferente dos resultados conclusivos sobre os benefícios da fitase na avicultura (Adebiyi et al., 2009; Silversides e Hruby, 2009), pesquisas ainda são necessárias para avaliação do potencial de utilização da fitase exógena na dieta de equinos. A ausência de efeitos desse aditivo enzimático sobre as concentrações séricas de minerais concordou com Moura et al. (2010), os quais não observaram efeito dessa enzima sobre a disponibilidade aparente de Ca e P dietético dos mesmos potros utilizados nesse experimento aos 269 dias de idade. Estes autores sugeriram como explicação para ausência de resultados, a utilização de dosagem insuficiente ou inativação da enzima ao longo do trato digestivo dos potros.

No Brasil, as dietas formuladas para equinos normalmente possuem relação Ca:P igual ou superior a 2:1, sendo uma recomendação nutricional preventiva para quadros de hiperparatireoidismo nutricional primário, causados pela ingestão de forrageiras tropicais com altas concentrações de quelantes de cálcio (oxalatos), ou secundário, causado pela ingestão de alimentos ricos em P fítico. Segundo Singh (2008), a concentração de minerais inorgânicos influencia na atividade da fitase exógena, havendo uma redução da ação dessa enzima em dietas com elevado nível de Ca ou P inorgânico, ou relação Ca:P na proporção de 2:1. Portanto, a hidrólise do fitato pela ação da fitase exógena fica reduzida em dietas com alto nível de P inorgânico, ocorrendo o inverso (maior liberação de P fítico) quando há um nível inferior de P inorgânico na dieta.

Outra característica que também pode ter interferido no estudo da fitase em equinos criados no Brasil é o fato das exigências nutricionais de minerais usadas para formulações de rações (Nutrients..., 2007; 1989) ainda serem baseadas em trabalhos antigos e com raças estrangeiras, sendo necessários estudos sobre exigências minerais para as raças equinas brasileiras. Dunnett et al. (2009) afirmaram que apenas adotando metodologias que levem em consideração os fatores que interferem no tipo de fitase exógena testada, tais como a concentração de Ca e P inorgânico da dieta, poderemos verificar o potencial desse aditivo em equinos.

As médias de fosfatase alcalina (FA) não foram influenciadas pelas dietas ($P > 0,05$), sendo as médias gerais observadas de: $190,5 \pm 27,2$ UI/L aos 173 dias; $156,2 \pm 24,5$ UI/L aos 205 dias; $173,6 \pm 19,4$ UI/L aos 232 dias; $151,9 \pm 40,3$ UI/L aos 267 dias; $136,7 \pm 17,2$ UI/L aos 302 dias; $141,2 \pm 18,0$ UI/L aos 332 dias e $127,5 \pm 15,6$ UI/L aos 363 dias de idade. Esses valores ficaram dentro dos valores de referência para equinos segundo Kaneko et al. (2008), de 143 a 395 UI/L, exceto aos 363 dias de idade. Por outro lado, as médias observadas nesse trabalho foram semelhantes as encontrados por Ramos et al. (2007) em equinos Mangalarga Marchador com quatro e 48 meses de idade, sendo possível admitir que existam diferenças nesse parâmetro entre as raças equinas.

Conforme ilustrado na figura 14, as médias de FA de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão: $Y = 231,171 - 0,288514 X$; onde $Y = \text{FA (UI/L)}$ e $X = \text{idade (dias)}$; $R^2 = 81,94\%$. A concentração sérica de FA dos potros Mangalarga Marchador estudados apresentou uma tendência de redução de $0,29$ UI/L ao dia, justificado pela taxa de crescimento dos animais. Segundo Silveira (1988), a FA encontra-se normalmente em maiores concentrações nos potros, em função do alto índice de metabolismo ósseo decorrente do crescimento, havendo uma diminuição esperada à medida que os animais ficam mais velhos.

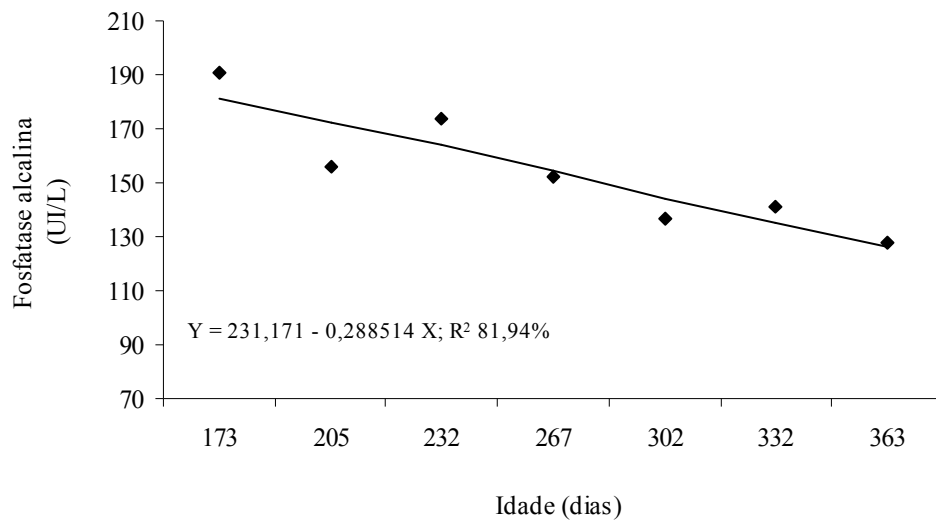


Figura 14. Concentração sérica de fosfatase alcalina (UI/L), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 7,95%.

Na comparação das dietas, também não houve diferença das concentrações séricas de uréia e creatinina dos potros Mangalarga Marchador estudados ($P > 0,05$).

As médias gerais das concentrações séricas de uréia foram: $32,9 \pm 10,5$ mg/dL aos 173 dias; $38,7 \pm 6,5$ mg/dL aos 205 dias; $34,3 \pm 19,4$ mg/dL aos 232 dias; $41,8 \pm 9,5$ mg/dL aos 267 dias; $46,0 \pm 5,1$ mg/dL aos 302 dias; $49,4 \pm 6,3$ mg/dL aos 332 dias e $56,0 \pm 9,8$ mg/dL aos 363 dias de idade. Esses resultados ficaram dentro do esperado para espécie equina (Kaneko et al., 2008; de 21,4 a 51,5 mg/dL), exceto aos 363 dias de idade; e se ajustaram significativamente em relação ao tempo ao seguinte modelo de regressão (figura 15): $Y = 11,8275 + 0,11552 X$; onde Y = uréia (mg/dL) e X = idade (dias); $R^2 = 91,15\%$. As concentrações séricas de creatinina observadas (0,8 a 1,4 mg/dL) ficaram dentro dos valores esperados para espécie (Kaneko et al., 2008; de 1,2 a 1,9 mg/dL) e não se ajustaram significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão, em relação ao tempo (dias).

A concentração sérica de uréia dos potros Mangalarga Marchador estudados apresentou uma tendência de aumento de 0,115 mg/dL ao dia. Esse discreto aumento da uréia aos 363 dias de idade provavelmente aconteceu pelo aumento no catabolismo protéico em virtude da melhoria da qualidade das pastagens com o início da estação chuvosa nos últimos meses de experimento (setembro, outubro e novembro; **vide** anexo – tabela 1). Como a dieta experimental foi balanceada considerando as recomendações do Nutrients... (1989), talvez ela possa ter excedido os requisitos protéicos necessários para crescimento de potros Mangalarga Marchador, sendo necessárias pesquisas sobre os reais requisitos nutricionais dessa raça equina brasileira.

Além dos benefícios esperados através da melhoria no aproveitamento da dieta através da suplementação com probióticos, este aditivo nutricional poderia potencializar o efeito imunomodulador da microbiota digestiva (Coppola e Turnes, 2004). As proteínas plasmáticas possuem muitas funções importantes para o organismo, sendo tradicionalmente analisadas por meio do método de biureto (proteínas totais) e eletroforese para fracionamento das cinco zonas de proteínas séricas na espécie equina: albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama-globulinas; sendo esta última zona corresponde às três classes inumoglobulínicas - IgG, IgA e IgM (Kaneko et al., 2008; Naoum, 1990).

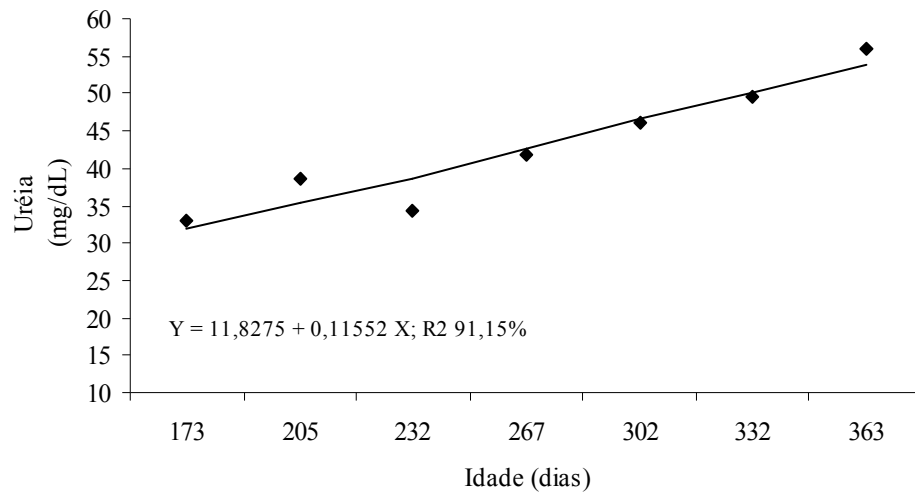


Figura 15. Concentração sérica de uréia (mg/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 18,07%.

Não houve efeito dos aditivos testados sobre as concentrações séricas de proteínas totais e fracionadas ($P > 0,05$), estando representadas na tabela 15 as médias de todos os animais durante os seis meses de experimento. Considerado os valores de referência para proteínas séricas sugeridos por Kaneko et al. (2008), houve redução da zona β -2-globulina nos animais aos 302 dias de idade, o que pode ser justificada pela vacinação anti-rábica que foi realizada nos potros neste período. Essa zona eletroforética das proteínas plasmáticas está relacionada com o complemento C3 (proteína que atua como mediador de inúmeras reações imunológicas) e sua diminuição são uma expressão de consumo e ativação desses fatores (Naoum, 1990).

Apenas as médias das proteínas séricas da zona α -1-globulinas, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao modelo de regressão (figura 16): $Y = 0,878692 - 0,00863119 X + 0,0000313259 X^2 - 0,0000000371456 X^3$; onde Y = concentração sérica de α -1-globulinas (g/dL) e X = idade (dias); R^2 96,83%. A menor e maior concentração sérica de alfa-1-globulinas, segundo a equação de regressão, foi de 0,098 mg/dL aos 242 dias e de 0,107 mg/dL aos 321 dias de idade, respectivamente. A proteína α -1-antitripsina é a principal responsável pela coloração da zona α -1-globulina (componente mais importante entre os “inibidores de protease”), aumentando em doenças de fase aguda (Naoum, 1990). Portanto, as diferenças observadas pelo teste SNK ($P < 0,05$), de diminuição dessa fração em função do tempo, não apresentaram significado clínico.

Tabela 15. Proteínas séricas totais, albumina e globulinas (frações α -1, α -2, β -1, β -2 e γ) de potros Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada com ou sem probióticos ou fitase

Idade (dias)	Proteínas totais	Albumina	α -1-globulinas	α -2-globulinas
Concentração sérica (g/dL)				
173 \pm 8 (desmame)	5,9	3,2	0,131 a	0,64
205 \pm 8	5,8	3,1	0,104 ab	0,63
232 \pm 12	5,7	3,0	0,098 b	0,66
267 \pm 11	5,9	3,1	0,103 ab	0,69
302 \pm 12	5,7	3,1	0,108 ab	0,68
332 \pm 12	5,6	3,0	0,103 ab	0,65
363 \pm 12	5,7	3,0	0,098 b	0,64
Idade (dias)	β -1-globulinas	β -2-globulinas	γ -globulinas	
Concentração sérica (g/dL)				
173 \pm 8 (desmame)	0,66	0,54 a	0,75	
205 \pm 8	0,66	0,47 ab	0,77	
232 \pm 12	0,66	0,50 ab	0,77	
267 \pm 11	0,69	0,49 ab	0,86	
302 \pm 12	0,7	0,40 c	0,79	
332 \pm 12	0,64	0,44 bc	0,76	
363 \pm 12	0,63	0,49ab	0,84	

CV = 7,07% (proteínas totais); 10,87% (albumina); 27,47% (α -1-globulinas); 15,12% (α -2-globulinas); 7,41% (β -1-globulinas); 8,34% (β -2-globulinas); 14,97% (γ -globulinas).

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$).

Médias com letras diferentes na coluna diferem pelo teste SNK ($P < 0,05$).

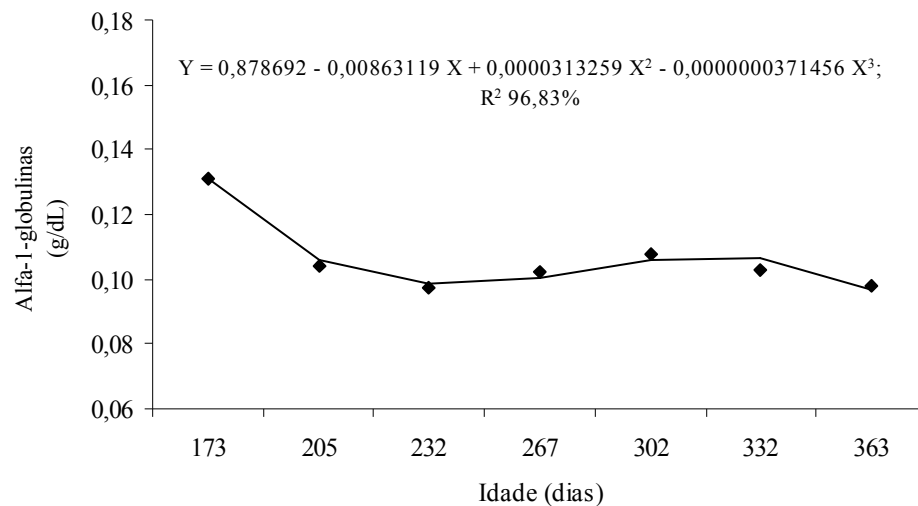


Figura 16. Concentração sérica de alfa-1-globulinas (g/dL), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 27,47%.

2.3.3 Índice cortical dos potros desmamados Mangalarga Marchador

Não houve diferença na comparação das médias do índice cortical dos potros alimentados com dietas suplementadas ou não com probióticos ou fitase exógena durante o período estudado ($P > 0,05$). Os valores médios gerais observados foram: 54,8% aos 235 dias; 56,3% aos 273 dias; 57,5% aos 308 dias; 58,4% aos 339 dias e 60,2% aos 368 dias de idade. Esses resultados foram superiores aos encontrados em potros Mangalarga Marchador por Rezende et al. (2000b), de 52,54% aos 311 dias de idade, e como os animais utilizados no presente trabalho pertenciam ao mesmo haras onde aqueles autores estudaram a curva de crescimento de potros, tais diferenças podem ter ocorrido pelas distintas dietas fornecidas aos animais.

Os resultados do índice cortical de todos os potros, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 17): $Y = 46,7146 + 0,0367598 X$; onde Y = índice cortical do metacarpo direito (%) e X = idade (dias); R^2 96,84%. Portanto, os animais apresentaram uma taxa de crescimento de 0,04% ao dia ou 1,1% ao mês para essa variável.

Moura et al. (2010), ao estudarem os mesmos potros do presente trabalho aos 269 dias de idade, observaram melhoria na disponibilidade aparente de Ca (grupos **B** e **C**) e P (grupo **C**) dos mesmos potros suplementados com probióticos e nenhum efeito nos animais suplementados com fitase (grupo **D**). Portanto, esperava-se observar algum efeito benéfico dos probióticos na mineralização óssea dos animais. Como a dieta fornecida foi balanceada para suprir todas as exigências nutricionais de animais (Nutrients..., 1989), o consumo da quantidade necessária de minerais através dos alimentos da dieta seria uma hipótese para não detecção dos benefícios esperados com probióticos. Os resultados observados de índice cortical nos animais suplementados com fitase exógena concordaram com a ausência de efeitos desse aditivo na disponibilidade aparente de minerais.

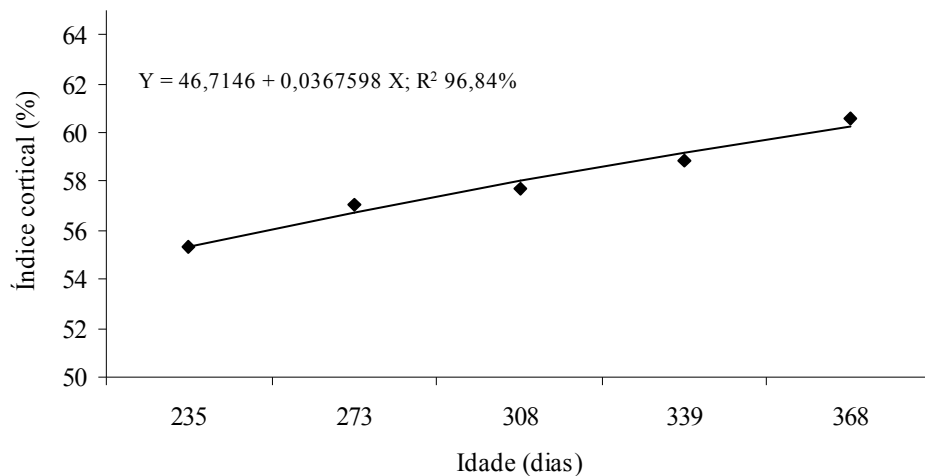


Figura 17. Índice cortical do terceiro metacarpo direito (%), em função da idade, de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase. Não houve diferença significativa entre dietas pelo teste SNK ($P > 0,05$); CV = 9,23%.

Por outro lado, os animais suplementados apenas com *S. cerevisiae* (grupo **B**) apresentaram maior ganho mensal de índice cortical (4,4%) aos 273 dias quando comparados aos demais grupos (-0,1 a 1,5%), conforme pode ser observado na tabela 16. A maior deposição óssea observada nos potros do grupo **B** concordou com o aumento da disponibilidade aparente de Ca na dieta desses animais aos 269 dias de idade (Moura et al., 2010), no entanto esperava-se observar tais efeitos também nos animais suplementados com bactérias e leveduras vivas (grupo **C**). Como a taxa de crescimento dos equinos dos seis aos 12 meses de idade é menor em relação ao seu desenvolvimento até os seis meses de idade (Cabral et al., 2004b; Rezende et al., 2000a), provavelmente a faixa etária estudada limitou a observação dos possíveis efeitos esperados.

Tabela 16. Valores médios dos ganhos mensais de índice cortical do terceiro metacarpo direito de potros desmamados Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada ou não com probióticos ou fitase

Idade (dias)	Dieta controle	Dieta com leveduras	Dieta com bactérias e leveduras	Dieta com fitase	Média Geral
Ganho mensal de índice cortical do terceiro metacarpo direito (%)					
273	0,9200B	4,4375A	1,5125B	-0,1375B	1,6831
308	0,6200A	-0,0625A	0,6700A	1,2950A	0,6306
339	1,0225A	1,8125A	2,0300A	-0,1625A	1,1756
368	1,4825A	0,5525A	1,1950A	3,8375A	1,7669

CV = 8,26%.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste SNK ($P < 0,05$).

O resultado de ganho mensal de índice cortical em relação ao tempo (dias) não se ajustou significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão.

A definição internacionalmente aceita na atualidade define probióticos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Guidelines..., 2002). Outra hipótese para ausência de efeitos do probiótico fornecido ao grupo **C** em relação ao grupo **B** seria as diferentes concentrações de *S. cerevisiae* nos aditivos. Segundo os níveis de garantia do fabricante, o probiótico do grupo **B** possui 10^9 ufc/g da levedura e o probiótico do grupo **C** possui 10^5 ufc/g. Além disso, o potencial probiótico pode diferir entre espécies e até mesmo entre diferentes cepas de uma mesma espécie microbiana, tornando-as incomparáveis (Maia et al., 2001; Weese, 2001). Portanto, seria interessante a realização de futuras pesquisas para melhor estudo dos possíveis benefícios dos aditivos testados na mineralização óssea de equinos utilizando-se exames de densitometria óssea (Frey et al., 1992), bem como início da avaliação a partir do nascimento e/ou da suplementação no *creep feeding* de potros lactentes (90 dias de idade).

As deformidades flexurais (“contraturas de tendões”) e displasias fiseais (fisites) em equinos jovens são afecções de origem multifatorial e relacionadas com suspeita de ganho compensatório após mudança de uma dieta marginal para abundante (Hintz et al., 1976, citado no Nutrients..., 2007). Não foi observada ocorrência de deformidades flexurais nos animais do presente trabalho, concordando com Rezende et al. (2000b) que também não observaram essa anormalidade ortopédica em potros Mangalarga Marchador alimentados com quantidade limitada de concentrado (1,5% PV) e mantidos em condições extensivas.

Rezende et al. (2000b) verificaram que os potros desmamados que não foram alimentados com concentrado acrescido de minerais (*creep feeding*) dos três aos seis meses de idade, apresentaram maior frequência de alterações na cartilagem epifisária do boleto e joelho do membro torácico direito. Não foi possível a avaliação de deformidades angulares ou displasias fiseais através dos exames radiográficos realizados no presente trabalho, sendo uma sugestão para avaliação do potencial dos probióticos para maximização da qualidade óssea de potros, a realização de seguintes exames complementares a avaliação clínica dos animais: biopsia e/ou densitometria óssea (Frey et al., 1992); avaliações radiográficas de alterações geométricas (angulação do desvio, determinação do “ponto pivô”) e morfológicas (largura assimétrica da fise e epífise radial distal, presença de “lip” e múltiplas linhas de calcificação na placa de crescimento metafisário, observação de esclerose do osso subcondral, colapso, fratura ou hipoplasia do osso carpal, deslocamento do osso carpal e do osso metacarpal) ósseas (Caron, 1988; Bertone et al., 1985).

2.4 Conclusões

Nas condições em que este experimento foi realizado, tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que:

A utilização de probióticos ou fitase exógena não influenciou no ganho de peso e desenvolvimento de medidas corporais de potros Mangalarga Marchador desmamados aos seis meses de idade e mantidos até o primeiro ano de vida em condições semi-extensivas de criação.

A suplementação com probiótico composto apenas por *S. cerevisiae* influenciou positivamente na mineralização óssea de potros aos 100 dias pós desmame, sendo necessárias mais pesquisas para confirmação dos efeitos desse aditivo no crescimento ósseo de potros.

Os aditivos testados não afetaram os parâmetros sanguíneos ligados ao status mineral e nitrogenado de potros desmamados Mangalarga Marchador criados em condições semi-extensivas.

Os aditivos testados, especialmente os probióticos, não afetaram na concentração de imunoglobulinas séricas de potros desmamados Mangalarga Marchador criados em condições semi-extensivas.

CAPÍTULO 3

VIABILIDADE E ANTAGONISMO *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS PRESENTES EM FÓRMULAS PROBIÓTICAS COMERCIAIS USADAS EM EQUINOS

Resumo: Objetivou-se avaliar a viabilidade de microorganismos presentes em probióticos comerciais usados em equinos, um composto por *S. cerevisiae* Sc47 (pó liofilizado – *probiótico 1*) e outro por *S. cerevisiae*, *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* (pasta ou pó por *spray drying* – *probiótico 2*), armazenados em duas diferentes temperaturas (4°C ou ambiente); e a produção *in vitro* de substâncias antagonistas contra *Salmonella* spp. e *E.coli*. Inicialmente, e em intervalos de 90 dias, até término da validade, alíquotas dos probióticos foram retiradas, diluídas, plaqueadas e incubadas para contagem de células viáveis (log₁₀ ufc/g do produto). O teste de antagonismo *in vitro* foi realizado pelo método de difusão em dupla camada. Os resultados foram analisados por estatística descritiva e equações de regressão. Houve diferenças na viabilidade de acordo com o modo de conservação, sendo a apresentação em pó, sem (*probiótico 1*) ou com resfriamento (*probiótico 2*), a forma mais adequada para manutenção de microorganismos viáveis por 12 meses após fabricação. O *probiótico 2* em pasta deve ter seu prazo de validade reduzido e ser armazenado a 4°C. As bactérias produtoras de ácido láctico produziram substâncias antagonistas *in vitro* que inibem o crescimento de patógenos causadores de diarreias em equinos, sendo necessários estudos *in vivo* para futura aplicação na espécie.

Palavras-chave: antagonismo, bactérias produtoras de ácido láctico, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella*, temperatura de estocagem

Abstract: The objective was to assess the viability of microorganisms in commercial probiotics used in horses, one composed of *S. cerevisiae* Sc47 (lyophilized powder – *probiotic 1*) and another of *S. cerevisiae*, *B. bifidum*, *E. faecium*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* (paste or powder by spray drying – *probiotic 2*), and stored at two different temperatures (4° C or room temperature); and to assess the *in vitro* production of antagonistic substances against *Salmonella* spp. e *E.coli*. Initially, and every 90 days until the validity expiration, aliquots of probiotics were withdrawn, diluted, plated and incubated for viable cell count (in log₁₀ cfu/g product). The *in vitro* antagonistic test was determined by double diffusion layer methodology. The results were evaluated by descriptive statistics and regression equations. There were differences in the viability of microorganisms according to the method of preservation, being the powder presentation (lyophilized or by drying spray), without (*probiotic 1*) or with (*probiotic 2*) cooling, the most appropriate form to maintaining viable microorganisms for 12 months after manufacturing. The *probiotic 2* in paste should has reduced the validity and be stored at 4oC. The lactic acid producing bacteria produces antagonistic substances that inhibit the growth of pathogens that cause diarrhea in horses, being necessary *in vivo* studies to future use on horses.

Keywords: antagonism, *Escherichia coli*, lactic acid producing bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella*, storage temperature

3.1 Introdução

A definição internacionalmente aceita na atualidade define probióticos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (Guidelines..., 2002). Os probióticos comerciais destinados para equinos são preparações de bactérias (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*) e/ou leveduras (*Aspergillus* e *Saccharomyces*) não patogênicas (Lewis, 2000), sendo seus mecanismos de ação basicamente os mesmos atribuídos à microbiota digestiva endógena: produção de substâncias antagonistas que inibem ou matam patógenos (Servin, 2004); competição com patógenos por sítios de adesão e fontes nutricionais (Servin e Coconnier, 2003); imunomodulação do hospedeiro (Ezendam e van Loveren, 2006); inibição da produção ou ação de toxinas bacterianas (Brandão et al., 1998). Os três primeiros mecanismos são normalmente atribuídos às bactérias produtoras de ácido láctico, enquanto os dois últimos são mais específicos de leveduras. Portanto, o potencial probiótico difere entre espécies e até mesmo para diferentes cepas de uma mesma espécie microbiana, tornando-as incomparáveis (Isolauri et al., 2004, citados por Saad, 2006; Maia et al., 2001; Weese, 2001; Nicoli et al., 2000, citado por Martins 2008a).

A concentração e viabilidade microbiana em produtos comerciais humanos e veterinários vêm sendo questionadas, pois para que um microorganismo probiótico possa expressar todos os benefícios esperados, ele deve chegar viável, metabolicamente ativo e em quantidade suficiente no ecossistema onde se espera que ele deva atuar (Weese, 2001).

Em ecologia microbiana, espera-se que um microorganismo procariota (bactérias) possa agir no ecossistema onde ele habita somente quando presente em concentração igual ou superior 10^7 ufc de células viáveis/g do conteúdo. No caso de leveduras (células eucariotas), essa concentração pode ser de 10 a 100 vezes inferior, devido seu tamanho maior quando comparado com células procarióticas. A concentração de células viáveis do probiótico deve ser, portanto, ajustada na preparação inicial, levando-se em conta a capacidade de sobrevivência do microorganismo sem se multiplicar no sistema digestório do hospedeiro e o efeito de diluição intestinal, para que possa atingir a concentração mínima funcional (10^8 a 10^9 ufc/g). Além do número adequado de células viáveis no produto original e da capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal, uma preparação probiótica deve apresentar um tempo longo de sobrevivência nas condições de armazenamento até sua utilização. Portanto, é importante que os produtos probióticos apresentem, quando comercializados, todas as características necessárias para sua atuação, tanto para benefício do consumidor como para a credibilidade do conceito desse aditivo nutricional (Martins et al., 2008a,b; Saad, 2006).

Martins et al. (2008a) avaliaram a concentração de células vivas de seis probióticos liofilizados compostos pela levedura *Saccharomyces boulardii* comercializados no Brasil, sendo que apenas três produtos apresentaram contagens iguais ou superiores ao indicado pelo fabricante (10^9 ufc/100 mg do produto), os quais se mantiveram estáveis durante seis meses. Ao avaliarem o efeito da temperatura de estocagem (4° C ou ambiente) sobre a viabilidade de probiótico composto pela levedura *S. cerevisiae* em suspensão aquosa, Martins et al. (2008b) observaram concentração viável quase mil vezes menor que o esperado (10^8 ufc/mL), independente da temperatura de armazenamento. Isso refletiu negativamente na capacidade de reativação das células probióticas de *S. cerevisiae* e resposta imunomoduladora avaliada através da proliferação de células de Küpffer no fígado de camundongos isentos de germes associados com essa levedura.

Maia et al. (2001) avaliaram a produção de substâncias antagonistas *in vitro* entre microrganismos (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *S. cerevisiae*) presentes em probiótico para cães e gatos, e destes contra *Salmonella* Typhimurium, e observaram que o *L. acidophilus* apresentou ação antagonista contra o patógeno testado e *E. faecium*. Ao realizarem testes *in vivo* com camundongos isentos de germes, apenas o *E. faecium* promoveu proteção contra *Salmonella*, demonstrando a importância da realização de testes científicos para comprovação da eficácia de fórmulas comerciais disponíveis.

Tendo em vista que a manutenção da viabilidade durante estocagem do produto e a ação antagonista de microrganismos probióticos contra patógenos são pré-requisitos importantes para

obtenção de resultados em experimentos produtivos ou clínicos com equinos, objetivou-se avaliar o efeito do modo de conservação (apresentação e temperatura de estocagem) sobre a viabilidade de microorganismos presentes em probióticos comerciais usados na espécie equina; e estudar a produção de substâncias antagonistas *in vitro* dos microorganismos isolados nesses produtos contra dois agentes causadores de diarreia em equinos (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*).

3.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, durante o período de 31 de maio de 2008 a 01 de dezembro de 2009.

Para realização do teste de viabilidade, foram testadas duas fórmulas probióticas comerciais disponíveis no Brasil: *probiótico 1* – produto composto pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Sc47; *probiótico 2* – produto composto por bactérias produtoras de ácido lático (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*) e pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizadas oito amostras do *probiótico 1* na apresentação em pó por liofilização e com dois meses de fabricação; duas amostras do *probiótico 2* na apresentação em pasta e com dois meses de fabricação; oito amostras do *probiótico 2* na apresentação em pó por *spray drying* e com um mês de fabricação. Os probióticos foram adquiridos diretamente com seus fabricantes ou distribuidores, sendo todas amostras de lotes diferentes. Na tabela 1 estão apresentados os níveis de garantia descritos nos rótulos dos produtos probióticos testados.

Tabela 1. Níveis de garantia de duas fórmulas probióticas comerciais utilizadas em equinos

Microorganismo	“PROBIÓTICO 1”	“PROBIÓTICO 2”	
	apresentação em pó	apresentação em pó	apresentação em pasta
Concentração mínima (log ₁₀ ufc/g) ¹			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	6,52	7,52
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	6,22	7,22
<i>Enterococcus faecium</i>	-	6,22	7,22
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	6,22	7,52
Total de bactérias produtoras de ácido lático	-	6,99	7,99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	5,52	5,52

¹Prazo validade do produto estocado em ambiente seco e ao abrigo do sol e umidade: 12 meses após fabricação (*probiótico 1*); 18 meses após fabricação (*probiótico 2*).

Inicialmente os produtos foram identificados, alíquotados e armazenados em duas diferentes temperaturas: refrigerado em geladeira (4°C) e temperatura ambiental. Segundo Normais... (1992), as condições climáticas do município de Belo Horizonte são: 21,1°C (temperatura média anual); 27,1°C (temperatura máxima anual); 16,7°C (temperatura mínima anual); 72,2% (umidade relativa do ar); e 1491,3 mm (precipitação total anual).

No início do experimento e em intervalos de 90 dias, até oito meses (*probiótico 2* em pasta), 12 meses (*probiótico 1*) e 17 meses (*probiótico 2* em pó) após fabricação, alíquotas de cada amostra dos produtos comerciais foram retiradas e submetidas a diluições decimais em salina tamponada. Alíquotas das diluições adequadas foram plaqueadas pelo método *pour plate* em ágar MRS (Difco) acrescido de 100 mg/L de ciclohexamida, para enumeração bacteriana, e pelo método *spread plate* em ágar Sabouraud

dextrose (Acumedia) acrescido de 100 mg/L de cloranfenicol, para enumeração das leveduras. Após 48 horas de incubação aeróbica (Sabouraud) e anaeróbica (MRS) a 37°C, as colônias foram contadas e o resultado expresso em logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama (\log_{10} ufc/g), sendo as repetições realizadas em duplicata. Não foi possível a contagem diferencial das espécies bacterianas presente no *probiótico 2* durante o teste de viabilidade, tendo em vista a grande semelhança das colônias após plaqueamento das amostras em meio MRS.

A fim de verificar possíveis atividades inibitórias entre as cepas de bactérias produtoras de ácido láctico e da levedura probiótica estudada contra microorganismos causadores de diarreia em equinos, foi realizado o método de difusão em dupla camada para produção de substâncias inibitórias difusíveis, adaptado de Nardi et al., (1999) e Silva et al. (2001).

Os microorganismos utilizados como amostras produtoras de substâncias antagonistas foram às mesmas cepas probióticas presentes nas fórmulas comerciais usadas no teste de viabilidade, sendo que as espécies presentes no *probiótico 2* foram isoladas pelo fabricante e encaminhadas na forma liofilizada para utilização no presente experimento. A levedura *S. cerevisiae* cepa Sc47 do *probiótico 1* foi isolada a partir de amostras do produto comercial, por meio de alíquotas das colônias cultivadas em ágar Sabouraud, as quais foram transferidas para crescimento em caldo YPG e depois transferidas para tubo tipo *ependorf* com 50 μ L de glicerol esterilizado e congeladas a -20°C, para posterior utilização nos testes de antagonismo *in vitro*.

Como espécies reveladoras da produção de substâncias inibitórias difusíveis, foram utilizadas duas cepas isoladas de equinos com quadros de diarreia¹⁵ (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Saintpaul e *E. coli*) e duas cepas de referência (*S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 4238). A caracterização antigênica somática e flagelar do sorovar da *Salmonella* isolada de equinos foi realizada por meio da técnica de soro-aglutinação rápida, em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). A identificação do sorovar específico seguiu o esquema de Kauffmann-White, de acordo com os critérios de Popoff (2001). O sorovar identificado concordou com Hofer et al. (2000), os quais verificaram presença de *Salmonella* ser. Saintpaul em amostras de carne de equídeos abatidos no nordeste brasileiro. Os autores caracterizaram 98 sorovares, predominantemente classificados na subespécie I (ser. Anatum, ser. Carrau, ser. Saintpaul, ser. Agona e ser. Typhimurium), provavelmente observadas devido o contato das carcaças com excretas dos animais abatidos.

A ativação das bactérias produtoras para o teste de antagonismo *in vitro* foi feito em caldo MRS, a 37°C, durante 48 horas em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, EUA), contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10%H₂ e 5%CO₂. Após ativação, as culturas bacterianas foram cultivadas em caldo MRS, a 37°C, durante 24-48 horas em condições anaeróbicas. Em seguida, uma microgota de 5 μ L da cultura de cada bactéria produtora de ácido láctico crescida em caldo MRS por 24 horas, a 37°C, em anaerobiose, foi colocada no centro da placa contendo ágar MRS (“spot”).

Após incubação, a 37°C, por 48 horas em anaerobiose, as placas foram colocadas em posição invertida, sendo colocado 1,0 mL de clorofórmio em cada tampa. Após 30 minutos, as placas foram abertas para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de 3,5 mL de ágar BHI semi-sólido (0,75% de ágar), inoculado com 10⁷ ufc da cepa reveladora foi colocada sobre o ágar. Após incubação, a 37°C, por 24-48 horas em aerobiose, foi efetuada a leitura dos possíveis halos de inibição ao redor do “spot”. O critério de avaliação dos resultados foi à presença ou ausência do halo de inibição, independentemente do seu tamanho. As repetições foram realizadas em triplicata e o diâmetro dos halos medido com paquímetro digital (Digimatic Calipar, Mitutoyo, Japão).

O teste de antagonismo *in vitro* utilizando as duas cepas de *S. cerevisiae* foi realizado da mesma forma descrita anteriormente, diferenciando apenas pela utilização de caldo YPG (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) para cultivo e ativação das colônias de leveduras, e ágar Sabouraud, em condições de aerobiose a 37°C, para crescimento e produção das possíveis substâncias antagonistas difusíveis no meio de cultura.

¹⁵ IPEVE - Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas Ltda (Belo Horizonte – MG).

Os resultados dos testes de viabilidade do *probiótico 1* (pó) e *probiótico 2* (pasta ou pó) foram analisados por meio de estatística descritiva quantitativa (média±desvio padrão) e usados para cálculos de regressão. Os resultados do teste de antagonismo *in vitro* foram estudados por meio de estatística descritiva qualitativa (produção positiva = presença de halo de qualquer diâmetro; produção negativa = ausência de halo de inibição de crescimento).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1. Teste de viabilidade

Na figura 1 está representada a concentração de células vivas (\log_{10} ufc/g produto) da levedura *S. cerevisiae* cepa Sc47 presente no *probiótico 1* estocado em diferentes temperaturas, durante o prazo de validade estipulado pelo fabricante. Segundo o rótulo do produto, a levedura deveria apresentar concentração mínima de $10 \log_{10}$ ufc/g, concordando com os valores encontrados no produto aos dois meses após fabricação. No entanto, a concentração de leveduras vivas reduziu um logaritmo decimal de ufc/g do produto aos seis meses após fabricação, tanto nas amostras estocadas em geladeira ($9,84 \pm 0,07 \log_{10}$ ufc/g) ou em temperatura ambiente ($9,40 \pm 0,15 \log_{10}$ ufc/g), permanecendo nessa ordem de grandeza até os 12 meses de fabricação (término da validade).

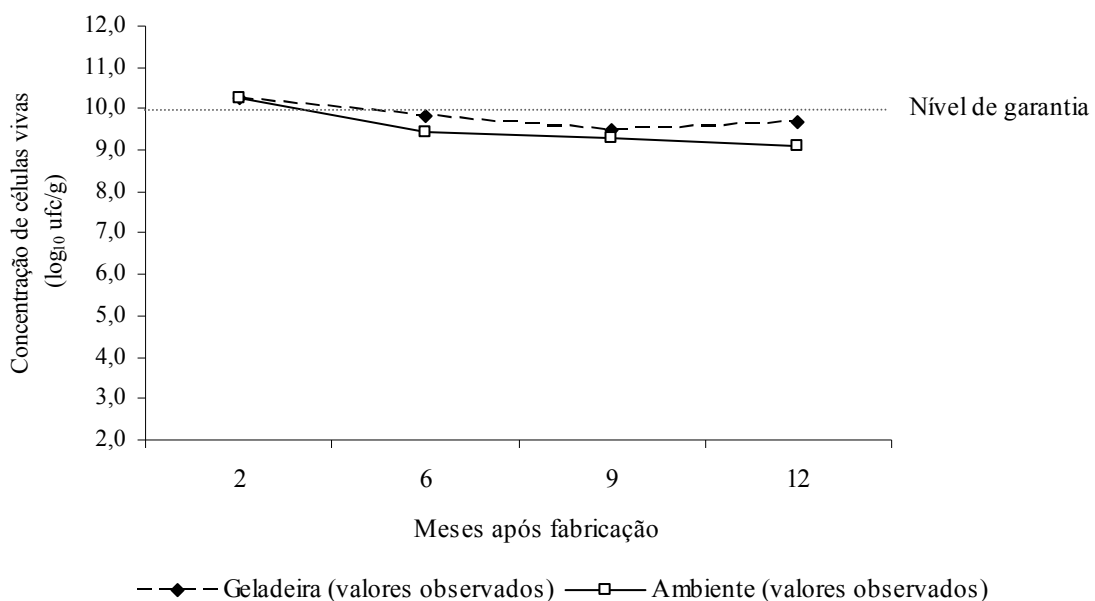


Figura 1. Concentração de leveduras vivas (*S. cerevisiae* Sc47) presentes no *probiótico 1* estocado em duas diferentes temperaturas

O resultado de viabilidade da levedura *S. cerevisiae* Sc47 presente no *probiótico 1*, em relação ao tempo (meses após fabricação), não se ajustou significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão.

Os resultados demonstraram que independente da temperatura de estocagem do *probiótico 1*, houve uma discreta redução na contagem de células vivas da levedura, mas não superior a 10% do valor garantido pelo fabricante. Era esperado que a estocagem na geladeira (4° C), em associação ao fato do produto ser liofilizado, retardasse a queda da viabilidade da levedura, porém isso não foi observado. Como Martins et al. (2008b) observaram concentração viável quase mil vezes menor que o esperado (10^8 ufc/mL) de probiótico composto pela levedura *S. cerevisiae* em suspensão aquosa, independente da temperatura de estocagem (4° C ou ambiente), provavelmente a liofilização é uma forma

de conservação suficiente para manutenção da viabilidade de leveduras, dispensando a necessidade de resfriamento. Segundo informações do fabricante, além do processo de liofilização realizado na apresentação em pó do *probiótico 1*, o produto recebeu uma camada de leveduras mortas para proteção das células vivas (processo denominado como “esferas”), visando potencializar a manutenção do microorganismo vivo até sua ingestão pelo animal.

Na figura 2 estão representadas a viabilidade das bactérias produtoras de ácido lático presentes no *probiótico 2* (apresentação em pasta ou pó), armazenadas em duas diferentes temperaturas de estocagem. Na apresentação em pasta, a concentração de bactérias produtoras de ácidos lácticos do *probiótico 2* ficou abaixo do valor mínimo esperado durante todo período avaliado (7,99 log ufc/g do produto), mantendo-se em níveis estáveis quando armazenado a 4°C (na ordem de 6,0 log₁₀ ufc/g) e reduzindo progressivamente nas amostras armazenadas em temperatura ambiente. Os resultados de viabilidade das bactérias produtoras de ácido lático presente no *probiótico 2* em pasta estocado em temperatura ambiente, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 2a): $Y = 6,4573 - 0,431418 X$; onde Y = concentração de bactérias vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pasta; R² 59,03%. A concentração de bactérias vivas no *probiótico 2* em pasta armazenado em temperatura ambiente, segundo a equação de regressão, reduziu numa taxa de -0,43 log₁₀ ufc/g para cada meses após fabricação do produto. A avaliação da viabilidade no *probiótico 2* em pasta foi interrompido com oito meses após fabricação, tendo em vista que nesse período já foram observadas concentrações muito abaixo do garantido pelo fabricante e recomendado pela literatura para obtenção de benefícios probióticos (10⁶ a 10⁷ ufc/g – Vanbelle et al., 1990).

No *probiótico 2* em pó, as concentrações de bactérias produtoras de ácido lático vivas observadas foram semelhantes ao garantido pelo fabricante (6,99 log ufc/g do produto) e permaneceram estáveis a 4°C durante 17 meses após fabricação. No entanto, quando o mesmo produto foi armazenado em temperatura ambiente, as concentrações de células vivas também decresceram progressivamente. Os valores observados de viabilidade das bactérias produtoras de ácido lático presentes no *probiótico 2* em pó estocado em temperatura ambiente, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 2b): $Y = 7,35215 - 0,297237 X$; onde Y = concentração de bactérias vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pó; R² 98,61%. A concentração de bactérias vivas no *probiótico 2* em pó armazenado em temperatura ambiente, segundo a equação de regressão, reduziu numa taxa de -0,30 log₁₀ ufc/g para cada meses após fabricação do produto. Esses resultados demonstraram que a secagem por *spray drying* associado ao resfriamento é o método de conservação mais recomendado para que as bactérias produtoras de ácido lático presentes no *probiótico 2* possam ser mantidas na forma viável durante estocagem para posterior administração em equinos.

Na figura 3 está representada a viabilidade da levedura *S. cerevisiae* armazenada em duas diferentes temperaturas de estocagem do *probiótico 2* (pasta ou pó). O produto em pasta, quando estocado em geladeira apresentou concentrações vivas de *S. cerevisiae* dentro do esperado (5,52 log ufc/g), mas houve uma queda progressiva na contagem de células vivas da levedura no mesmo produto estocado em temperatura ambiente. Os resultados de viabilidade das leveduras presente no *probiótico 2* em pasta estocado em temperatura ambiente, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 3a): $Y = 7,11042 - 0,539188 X$; onde Y = concentração de leveduras vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pasta; R² 81,35%. A concentração de leveduras vivas no *probiótico 2* em pasta armazenado em temperatura ambiente, segundo a equação de regressão, reduziu numa taxa de -0,54 log₁₀ ufc/g para cada meses após fabricação do produto.

O *probiótico 2* em pó armazenado em geladeira também apresentou concentrações viáveis de *S. cerevisiae* dentro do esperado durante todo período estudado, mas quando armazenado em temperatura ambiente ficou abaixo do nível de garantia do fabricante a partir dos sete meses após fabricação. Os resultados de viabilidade da levedura presente no *probiótico 2* em pó, em relação ao tempo, se ajustaram significativamente ao seguinte modelo de regressão (figura 3b): $Y = 5,64654 + (0,078585 X) - (0,0133184 X^2)$; onde Y = concentração de leveduras vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pó; R² = 89,62%. A maior concentração de *S. cerevisiae* na forma viável presente no *probiótico 2* em pó armazenado em temperatura ambiente, segundo a equação de regressão, foi de 5,76 log₁₀ ufc/g aos 3 meses após fabricação do produto.

Como os métodos de mais eficientes para conservação de microorganismos são desidratação, por liofilização ou secagem por *spray drying*, e resfriamento, provavelmente a maior atividade de água na apresentação na pasta, mantendo alta a taxa metabólica microbiana, e oscilações nas

condições ambientais, sofridas pelos produtos estocados em temperatura ambiente, ocasionaram na morte mais rápida das bactérias produtoras de ácido láctico e da levedura *S. cerevisiae* no *probiótico 2*, o que justificaria as diferenças nas contagens de células vivas entre as duas apresentações do mesmo produto, que era composto pelas mesmas cepas de bactérias e levedura.

A manutenção da viabilidade dos probióticos é muito importante, pois a ação antagonista contra patógenos, através da exclusão competitiva por sítios de fixação, nutrientes e/ou produção de substâncias antimicrobianas, depende do cumprimento desse pré-requisito do aditivo.

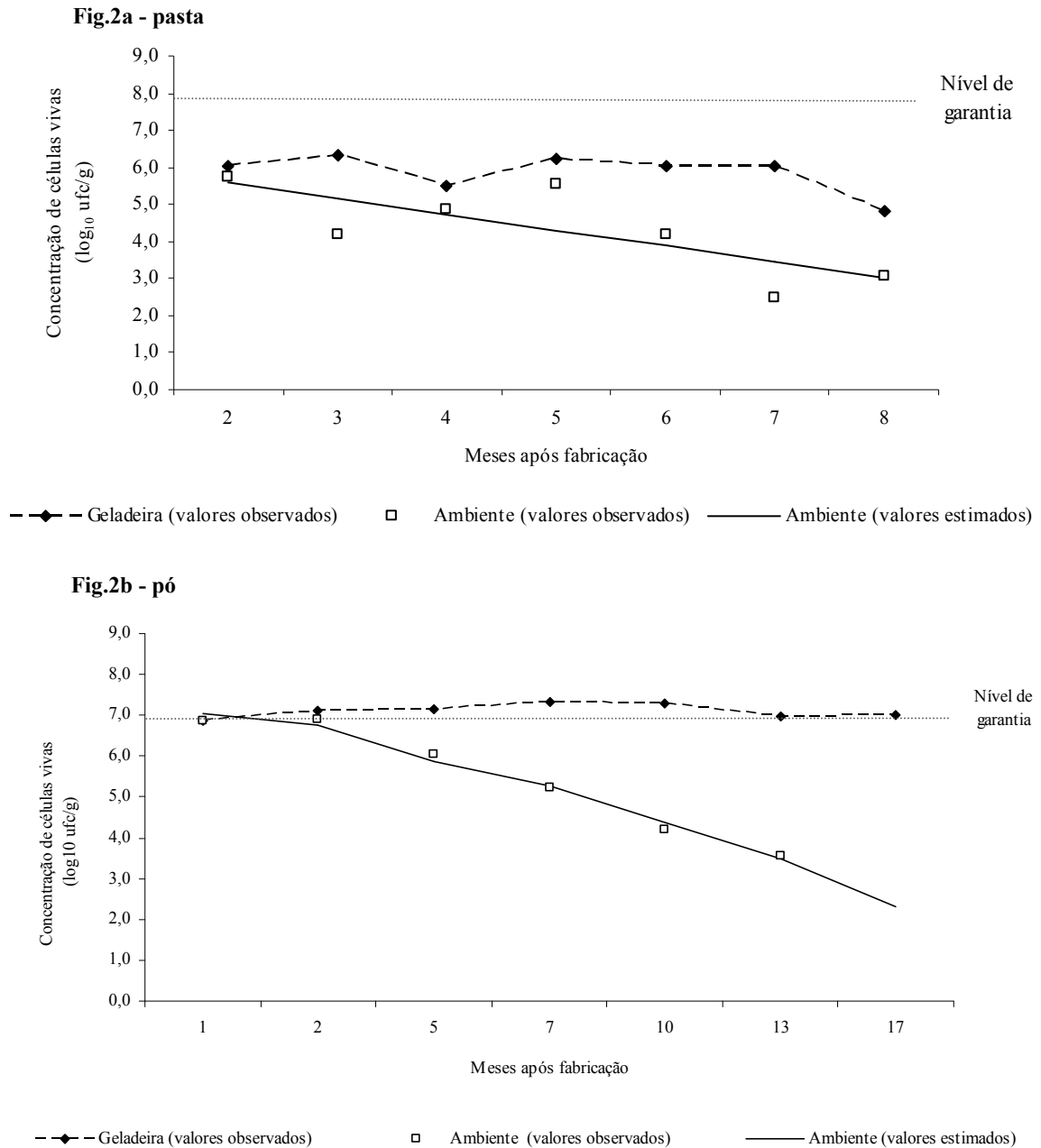


Figura 2. Viabilidade de bactérias produtoras de ácido lático (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*) presentes no *probiótico 2* em pasta (2a) e em pó (2b), armazenado em duas diferentes temperaturas

Os resultados de viabilidade das bactérias produtoras de ácido lático presente no *probiótico 2* (pasta ou pó) armazenado em geladeira, em relação ao tempo (meses após fabricação), não se ajustaram significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão.

Os modelos previstos para concentração de bactérias produtoras de ácido lático vivas presente no *probiótico 2* (pasta ou pó) armazenado em temperatura ambiente foram calculados pelas seguintes fórmulas:

Apresentação em pasta: $Y = 6,4573 - 0,431418 X$; onde Y = concentração de bactérias vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pasta; R² 59,03%.

Apresentação em pó: $Y = 7,35215 - 0,297237 X$; onde Y = concentração de bactérias vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pó; R² 98,61%.

Fig.3a - pasta

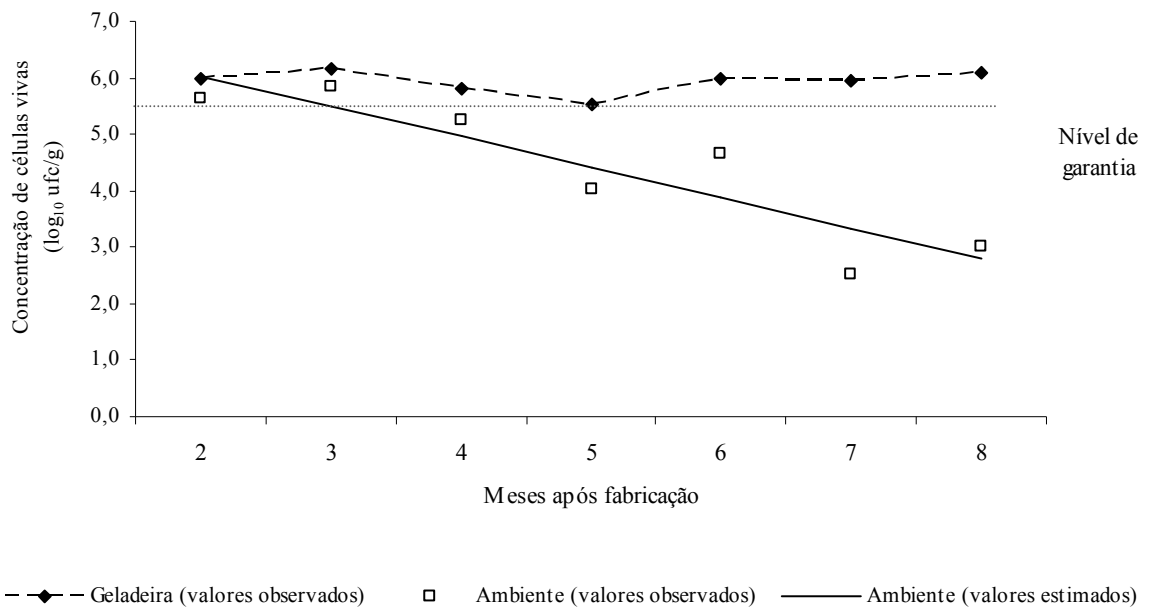


Fig.3b - pó

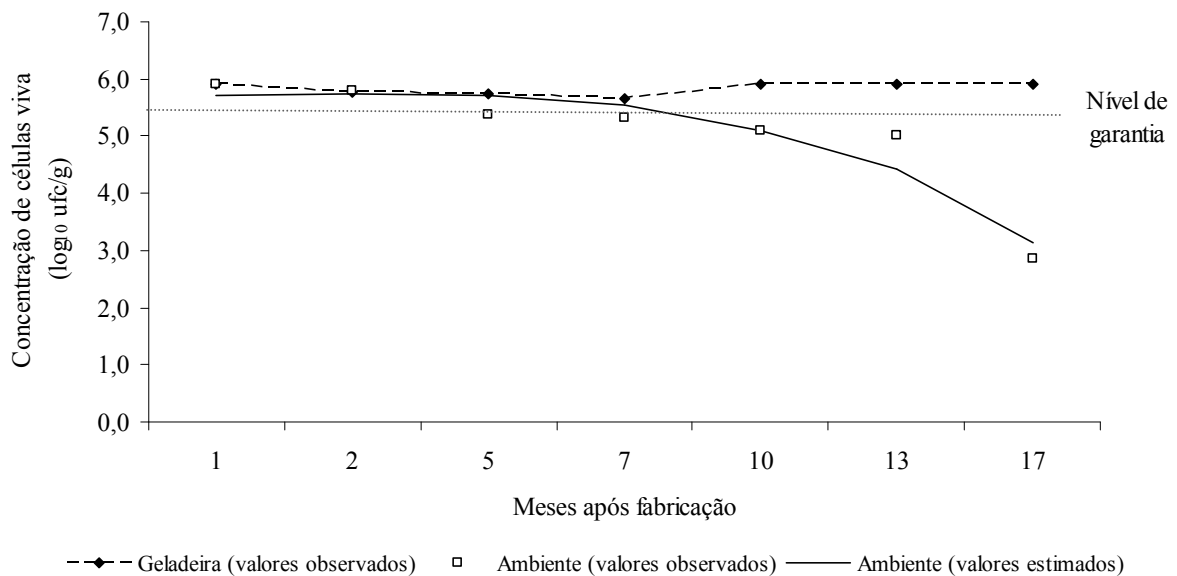


Figura 3. Viabilidade da levedura *S. cerevisiae* presente no *probiótico 2* em pasta (3a) e em pó (3b), armazenado em duas diferentes temperaturas

Os resultados de viabilidade de *S. cerevisiae* presente no *probiótico 2* (pasta ou pó) armazenado em geladeira, em relação ao tempo (meses após fabricação), não se ajustaram significativamente a nenhum dos modelos matemáticos pré definidos na regressão.

Os modelos previstos para concentração de leveduras vivas presente no *probiótico2* (pasta ou pó) armazenado em temperatura ambiente foram calculados pelas seguintes fórmulas:

Apresentação em pasta: $Y = 7,11042 - 0,539188 X$; onde Y = concentração de leveduras vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pasta; R² 81,35%.

Apresentação em pó: $Y = 5,64654 + 0,078585 X - 0,0133184 X^2$; onde Y = concentração de leveduras vivas no produto (log₁₀ ufc/g) e X = meses após fabricação do *probiótico 2* em pó; R² 89,62%.

3.3.2. Teste de antagonismo *in vitro*

Na tabela 2 estão apresentados os resultados do teste de antagonismo *in vitro* dos microorganismos presentes no *probiótico 1* e *probiótico 2*, contra *Salmonella* ssp. e *E. coli*. Como não houve uma padronização do diâmetro e quantidade de meio de cultura distribuído nas placas utilizadas neste experimento, a interpretação dos dados consistiu na observação da presença ou ausência de halo de inibição, independentemente de seu tamanho. Com exceção das duas cepas de *S. cerevisiae*, todas as bactérias produtoras de ácido lático testadas produziram substâncias antagonistas contra *Salmonella* e *E. coli*, em condições *in vitro*.

Tabela 2. Presença de halo de inibição de crescimento de patógenos por microorganismos isolados de probióticos comerciais

Microorganismo probiótico	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	ser. Typhimurium ATCC 14028	ser. Saintpaul (isolado equino)	ATCC 4238	Isolado equino
	Presença de halo de inibição de crescimento (tamanho em mm)			
<i>L. acidophilus</i>	+ (43,86 ± 3,12)	+ (39,60 ± 3,61)	+ (38,09 ± 1,82)	+ (33,93 ± 5,76)
<i>L. plantarum</i>	+ (54,39 ± 0,33)	+ (51,41 ± 2,08)	+ (47,66 ± 0,55)	+ (42,86 ± 1,43)
<i>E. faecium</i>	+ (29,22 ± 6,37)	+ (27,65 ± 7,32)	+ (32,88 ± 0,21)	+ (25,78 ± 1,86)
<i>B. bifidum</i>	+ (49,81 ± 4,49)	+ (52,02 ± 3,47)	+ (47,07 ± 0,79)	+ (44,49 ± 1,32)
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> Sc47	-	-	-	-

Legenda: presença de halo de inibição de qualquer diâmetro (+); ausência de halo de inibição de crescimento (-).

Existem vários mecanismos para justificar a ação protetora dos probióticos contra patógenos: resistência a colonização, por meio da competição por sítios de adesão e/ou nutrientes; ação imunomoduladora no hospedeiro; produção de substâncias antimicrobianas; e inibição da ação de toxinas bacterianas (Ezendam e van Loveren, 2006; Brandão et al., 2005; Servin, 2004; Servin e Coconnier, 2003). Como a produção de substâncias antimicrobianas não é um mecanismo antagonista comum nas leveduras, a ausência de halos de inibição no teste *in vitro* não é suficiente para concluir sobre o potencial antagonista das duas cepas *S. cerevisiae* contra os patógenos testados. Pérez-Sotelo et al. (2005) explicaram que várias cepas de bactérias potencialmente patogênicas se aderem na parede celular da *S. cerevisiae*, sendo um importante mecanismo para proteção contra infecções em animais suplementados com essa levedura. Esses autores avaliaram a capacidade de adesão de 45 isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (sorovares Typhimurium, Choleraesuis, Anatum, Bredeney, Agona, Reading, Monofasica, London e Enteritidis) na parede celular da levedura *S. cerevisiae* cepa Sc47 e observaram que 57,7% (26/45) dos isolados e 66,6% (6/9) dos sorovares de *Salmonella* aderiram-se na levedura. A afinidade por cepas de *Salmonella* que expressam fimbrias tipo 1 ocorre através dos mananoligossacarídeos (MOS) presentes na parede celular. Outro mecanismo de proteção promovido por leveduras probióticas é a imunomodulação, onde as betaglucanas presentes na parede celular estimulam aumento de tecido linfóide (placas de Peyer) e respostas do sistema imune, como produção de imunoglobulinas A e células de Küpffer (Martins et al., 2007; Nordmo, 2009).

3.4 Conclusões

Nas condições em que este experimento foi realizado, tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que:

A apresentação em pó, por liofilização ou secagem por *spray drying*, sem (*probiótico 1*) ou com (*probiótico 2*) estocagem em temperatura de resfriamento (4°C), é o modo de conservação mais adequado para manutenção da viabilidade de microorganismos presentes nos probióticos testados durante o prazo de validade informado pelos fabricantes.

Especificamente para o *probiótico 2* na apresentação em pasta, sugere-se a redução do seu prazo de validade e recomendação de armazenamento em temperatura de refrigeração, visando a garantia da ingestão de células vivas no momento da administração para equinos.

As bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*) produzem substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de patógenos causadores de diarreias em equinos (*E. coli* e *Salmonella* ser. Saintpaul), sendo necessários estudos *in vivo* para melhor avaliação destas, juntamente com a levedura *S. cerevisiae*, para futura aplicação na espécie equina.

CAPÍTULO 4

ESTABILIDADE ENZIMÁTICA *IN VITRO* DE UMA FITASE EXÓGENA USADA NA DIETA DE EQUINOS

Resumo: Objetivou-se estudar a estabilidade enzimática de fitase exógena comercial em diferentes faixas de pH (2,3; 2,6; 2,9; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) e em condições *in vitro* de digestão estomacal (péptica) e pré-cecal (péptica e pancreática) equina. No ensaio para avaliação dos efeitos do pH, a dose testada da enzima foi de 500 FTU e nos demais ensaios foram testadas três diferentes dosagens (0, 500 e 1250 FTU). A digestão péptica foi realizada em três faixas de pH (2,3; 2,6 e 2,9), seguida pela digestão pancreática em quatro tempos (1, 2, 3 ou 4 horas). A atividade enzimática foi avaliada indiretamente através da quantidade de fósforo fítico liberado, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$) e equações de regressão. A atividade catalítica da fitase foi observada nas diferentes faixas de pH testadas, sendo maior ($P<0,05$) a liberação de P em pH 2,3 quando comparada com pH neutro. Na digestão péptica, houve maior liberação de P nos tratamentos com inclusão da fitase, sendo maior a concentração de P com o aumento da dose da enzima ($P<0,05$). A enzima também não foi inativada na digestão pré-cecal e teve sua atividade aumentada quando o tempo de retenção foi acima de duas horas. A fitase exógena estudada manteve sua atividade enzimática em condições *in vitro* de oscilação de pH e ataque de enzimas presentes no estômago e intestino delgado equino.

Palavras-chave: aditivo, ácido fítico, fósforo, pH, pepsina, pancreatina

Abstract: The objective was to study the enzymatic stability of an commercial exogenous phytase on different pH ranges (2.3, 2.6, 2.9, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0) and on simulated *in vitro* conditions of stomach (peptic) and pre-cecal (peptic and pancreatic) equine digestion. In the trial to assess the effects of pH, was used the dosage of 500 FTU of enzyme and in the other trials were used three different dosages (0, 500 and 1250 FTU). The peptic digestion was performed in three pH ranges (2.3, 2.6 and 2.9), followed by pancreatic digestion in four times (1, 2, 3 or 4 hours). The enzyme activity was assessed indirectly through the amount of fitic phosphorus released, and results were compared using Tukey test ($P<0.05$) and regression equations. The catalytic activity of phytase was observed throughout different pH ranges, with the highest ($P<0.05$) P release at pH 2.3 when compared with neutral pH. In peptic digestion, there were greater release of P in all pH ranges tested in treatments with addition of phytase, having a higher P concentration with the increase of enzyme dosages ($P<0.05$). The enzyme was not inactivated in the pre-cecal digestion and had its activity increased when the retention time was above two hours. The commercial exogenous phytase retained the enzymatic activity on *in vitro* conditions of pH variation and the attack of enzymes present in the stomach and small intestine of horses.

Keywords: additive, pancreatin, pepsin, pH, phosphorus, phytic acid

4.1 Introdução

A utilização da fitase exógena (hexaquifosfato mio-inositol (1,2,3,4,5,6) fosfohidrolase) como aditivo na dieta de monogástricos é uma estratégia nutricional para redução dos efeitos antinutricionais do ácido fítico sobre a absorção dos minerais quelatos nessa molécula (P, Ca, Fe, K, Mg, Mn e Zn).

Segundo Frontela et al. (2008), as fitases microbianas são produzidas por espécies de fungos (*Aspergillus*), leveduras (*Saccharomyces* e *Peniophora*) e algumas bactérias (*Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*), sendo classificadas como enzimas ácidas do tipo 3-fitase (E.C. 3.1.3.8), ou seja, possuem atividade ótima em pH ácido e iniciam a hidrólise da molécula de ácido fítico no grupo fosfato da posição 3 da molécula. Elas possuem maior estabilidade físico-química quando comparadas com as fitases vegetais, tornando-as de melhor potencial tecnológico para indústria alimentícia. Sua atividade enzimática é expressa em unidades de atividade de fitase (FTU), sendo definida como a quantidade de fitase que libera 1 micromol (μmol) de fosfato inorgânico por minuto de uma solução de 0,0051 mol por litro de fitato de sódio em pH de 5.5 e temperatura de 37°C (Phytase...,2005).

Poucos experimentos testaram a aplicação *in vivo* de fitase exógena na espécie equina (Dunnett et al., 2009; Moura et al., 2009, 2010; Hainzea et al., 2004; Van Doorn et al., 2004; Patterson et al., 2002; Morris-Stoker et al., 2001, citado por Patterson et al., 2002), com resultados insuficientes para recomendação prática desse aditivo. As hipóteses levantadas na literatura para ausência de melhorias no aproveitamento de P e, conseqüentemente, no desempenho de equinos foram: desnaturação da enzima no sistema digestório equino; utilização de dosagens insuficientes; grande quantidade de Ca e/ou P de origem inorgânica nas dietas fornecidas para equinos, com relação Ca:P variando de 1:1 a 6:1; ou interação da enzima com diferentes dietas usadas para equinos.

Diante das vantagens nutricionais esperadas com a suplementação de fitase exógena na dieta de monogástricos, são necessários estudos que auxiliem na compreensão dos fatores que afetam na obtenção destes benefícios também na espécie equina. Nesse experimento objetivou-se avaliar a estabilidade enzimática de uma fitase exógena de origem microbiana usada na dieta de equinos, por meio de ensaios para avaliação dos efeitos de pH e da presença de enzimas endógenas presentes no sistema digestório equino.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG, sendo dividido em três ensaios: I. teste de estabilidade da fitase sob variação do pH; II. teste de estabilidade da fitase em condições *in vitro* de digestão estomacal (péptica); III. teste de estabilidade da fitase em condições *in vitro* de digestão pré-cecal (péptica e pancreática).

Em todos os ensaios foi utilizada uma fitase exógena (mio-inositol-hexafosfatase β -fosfohidrolase) produzida comercialmente¹⁶ através de fermentação com fungos *Aspergillus niger* e fitato de sódio¹⁷ como substrato enzimático. A atividade enzimática da fitase foi determinada indiretamente por meio da porcentagem de P fítico liberado e quantificado por meio de colorimetria a 750 nm (Cunniff, 1995).

No ensaio I foi testada a ação da fitase exógena nos seguintes valores de pH: 2,3; 2,6; 2,9; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0; adaptado de Simons e Versteegh (1990) e Liu et al. (1997). Segundo Kern et al. (1974), o pH da região fúndica e pilórica do estômago, e do íleo de equinos alimentos com volumosos é:

¹⁶Mínimo por g: 5000 FTU.

¹⁷ Sal de hidrato de ácido fítico sódico de arroz (P 8810) – Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.

5,4; 2,6 e 7,4, respectivamente. Brandi e Furtado (2009) afirmaram que o pH na região média do estômago varia entre 5 e 6, enquanto na região pilórica pode atingir 2,6 em dietas exclusivas de volumosos.

Foram pesados 0,1 g (500 FTU) de fitase e diluídos em tubos de ensaio contendo 0,01 g de fitato de sódio e 2 mL da solução do pH de cada um dos valores pré-determinados. Os sete valores de pH estudados foram obtidos por tentativa e erro, com a adição de HCl e/ou NaOH. Foram feitas cinco repetições por pH. Em seguida, os tubos foram levados para incubação em aparelho shaking¹⁸ (130 rpm) a 38°C, por uma hora, e analisados quanto à concentração de P liberado no sobrenadante. O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, sendo as médias das concentrações de P comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e usadas para análise de regressão.

A estabilidade enzimática da fitase nos ensaios II e III foi testada sob condições *in vitro* da digestão equina estomacal (péptica) e pré-cecal (péptica e pancreática), respectivamente, adaptado de Liu et al. (1997) e Abdouli e Ben Attia (2007).

No ensaio II foi realizada a digestão péptica em três valores de pH (2,3; 2,6; 2,9), simulando o pH fisiológico do estômago do equino. Foram utilizados tubos de ensaio contendo 5 mL de solução com 3000 unidades de pepsina¹⁹ (6% p./v.), 2 ml de HCl 0,2 N, 0,01 g de fitato de sódio sem ou com adição de 0,1 g (500 FTU) ou 0,25 g (1250 FTU) de fitase. A concentração de pepsina utilizada foi definida de acordo com Furuya et al. (1979), os quais afirmaram que a digestibilidade da proteína *in vitro* em suínos foi similar com concentrações de pepsina variando de 2.000 a 40.000 unidades por grama da dieta. As amostras foram homogeneizadas em agitador²⁰ e incubadas ao aparelho shaking⁵ (130 rpm) a 38°C, por 30 minutos. O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3 x 3 (três valores de pH e três concentrações de fitase), com cinco repetições por faixa de pH testada, totalizando 45 observações.

Ao final da digestão péptica do ensaio II, foi realizada a digestão pré-cecal (péptica seguida pela pancreática). Nessa etapa, foi adicionado ao material digerido 0,65 ml de NaHCO₃ 1 M, para ajuste do pH para 7,0, e 3,7 mg de pancreatina¹⁵/ mL (2,4mg de pancreatina / 0,01g de fitato de sódio). O resíduo da digestão pancreática foi transferido para erlermeyer de 100 mL contendo 0,05 M de tampão succinato (pH 6.0) e NaCl 0,1 M, sendo em seguida levado para aparelho *shaking*⁵ (130 rpm) a 38°C, por 1, 2, 3 ou 4 horas. A quantidade de P liberado foi determinada através de colorimetria (750nm) (Cunniff, 1995).

Os tempos de digestão pancreática foram estipulados de acordo com Wolter (1975), o qual afirmou que o tempo médio de retenção da digesta no intestino delgado equino é de duas a três horas. Segundo Brandi e Furtado (2009), o tempo médio de esvaziamento do intestino delgado é de 1,5 a 2 horas, para alimentos sólidos, enquanto para líquidos o tempo pode variar de 45 minutos a 1 hora.

O delineamento utilizado no ensaio II foi inteiramente ao acaso, em arranjo de parcelas subdivididas, sendo a parcela composta por uma combinação fatorial 3 x 3 (três valores de pH e três concentrações da fitase), e as subparcelas os quatro tempos de digestão pancreática. Foram feitas cinco repetições por tempo, totalizando 180 observações. As variâncias foram analisadas e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹⁸ Controlled environment incubator shaker (New Brunswick Scientific).

¹⁹ VETEC QUÍMICA FINA LTDA.

²⁰ Mixer Thermoline Corporation, modelo número M-16715.

4.3 Resultados e Discussão

Na tabela 1 e figura 1 estão apresentadas os percentuais de liberação de P fítico sob ação da enzima fitase em diferentes faixas de pH (2,3 a 7,0). Foi observada atividade catalítica em todo intervalo de pH avaliado, sendo a liberação de P maior em pH 2,3 ($P < 0,05$) quando comparada com pH neutro. Esse resultado era esperado, pois as fitases microbianas sendo classificadas como enzimas ácidas do tipo 3-fitase (E.C. 3.1.3.8) (Bohn et al., 2008; Frontela et al., 2008), ou seja, possuem atividade enzimática ótima em pH ácido.

Tabela 1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática de fitase exógena comercial

pH	% Fósforo fítico liberado
2,3	1,70 ^A
2,6	1,55 ^{AB}
2,9	1,54 ^{AB}
4,0	1,46 ^{AB}
5,0	1,53 ^{AB}
6,0	1,60 ^{AB}
7,0	1,40 ^B

CV = 8,16 %.

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

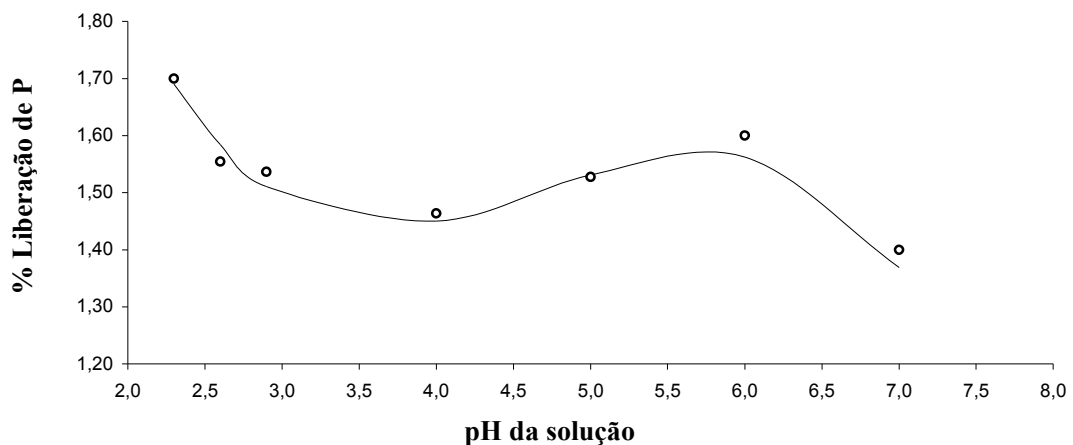


Figura 1. Percentual de fósforo fítico liberado sob ação da enzima fitase em diferentes faixas de pH. O modelo previsto foi calculado pela fórmula: $Y = 4,10 - 1,84 X + 0,41 X^2 - 0,029 X^3$; onde Y = % de liberação de fósforo e X = pH da solução. $R^2 = 0,96$. DMS = 0,2682.

Os resultados encontrados concordaram com Simons e Versteegh. (1990), os quais avaliaram a atividade *in vitro* da fitase na faixa de pH entre 1,0 e 7,0. Estes autores observaram que essa enzima foi ativa em uma ampla faixa de pH e que permaneceu estável no estômago dos animais com pH entre 2,0 e 5,0, sendo os valores ótimos de pH para atividade da enzima de 2,5 e 5,5.

Segundo Valente et al. (2000), os aditivos enzimáticos podem sofrer desnaturação durante o processo de digestão, pois estão sujeitas às variações de pH e ação das enzimas endógenas secretadas no sistema digestório do animal. Na tabela 2 estão apresentadas as quantidades de P fítico liberado em solução péptica (digestão péptica), sob efeito de diferentes concentrações de fitase exógena e nos três valores de pH testados. Na ausência da fitase observou-se liberação de P, podendo esse resultado ser explicado pela presença de P nos reagentes utilizados ou solubilização de minerais em pH ácido. A variação de pH testada não afetou a atividade enzimática da fitase exógena, sendo maior a liberação de P fítico com o aumento da dosagem da enzima utilizada.

Tabela 2. Concentração de fósforo (P) fitico liberado em solução péptica e sob efeito de diferentes dosagens de fitase exógena e variações de pH

Fitase (FTU)	P fitico liberado (%)		
	2,3 pH	2,6 pH	2,9 pH
0	0,0655Bc	0,0677Bc	0,0994Ac
500	0,2646Ab	0,2817Ab	0,2629Ab
1250	0,4375Aa	0,4175Aa	0,4100Aa

Letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas na coluna, indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
CV = 7,23%.

Não houve interação entre pH, dosagens da fitase exógena e tempo de digestão pré-cecal (péptica e pancreática) ($P > 0,05$), sendo apresentado na tabela 3 as concentrações de P fitico liberado nas tres dosagens da fitase exógena de acordo com o tempo de digestão pancreática ($P < 0,05$). A presença das enzimas digestivas (pancreatina e pepsina) não inativaram a fitase, mantendo o aditivo enzimático sua atividade catalítica ao longo do tempo e das doses testadas. Esse resultado concordou com Liu et al. (1997), os quais verificarem aumento linear da liberação de P ao simular *in vitro* a digestão de suínos alimentados com dietas a base de milho e soja na presença de fitase.

Tabela 3. Concentração de fósforo (P) fitico liberado em diferentes dosagens de fitase exógena e submetidos a quatro tempos de digestão pancreática

Fitase (FTU)	P fitico liberado (%)			
	Tempo da digestão pancreática (horas)			
	1	2	3	4
0	0,0258Bb	0,0409Ac	0,0380Ac	0,0388Ab
500	0,0529Ca	0,0613Bb	0,0644Bb	0,0805Aa
1250	0,0573Da	0,0667Ca	0,0735Ba	0,0801Aa

Letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas na coluna, indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
CV = 19,14%.

Segundo Brandi e Furtado (2009), o tempo médio de esvaziamento do intestino delgado de equinos é de 1,5 a 2 horas, para alimentos sólidos, de 45 minutos a 1 hora para alimentos líquidos. No ensaio III (digestão péptica e pancreática) observou-se que o aumento do tempo de digestão pancreática aumentou progressivamente a liberação do P fitico, concordando com Liu et al. (1997) que também observaram aumento na liberação do P, em resposta ao aumento do tempo de digestão pancreática de uma para cinco horas.

Esses resultados *in vitro* do presente experimento concordam com a hipótese de Dunnett et al. (2009), de que o maior fracionamento do concentrado seria uma manejo estratégico para obtenção de resultados sobre o aproveitamento de P fitico através da suplementação com fitase exógena. Esses autores observaram aumento na digestibilidade aparente do P em equinos alimentados com concentrado com uma redução de 0,8% de fosfato bicálcico e contendo cerca de 600 FTU/kg concentrado de fitase exógena, justificando os resultados obtidos através da redução níveis de Ca:P da dieta e oferecido da ração concentrada em três pequenas porções diárias, favorecendo a ação dessa enzima no estômago (local onde o pH é mais favorável para sua ação).

4.4 Conclusões

Nas condições em que este experimento foi realizado, tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que:

A fitase exógena comercial estudada mantém sua atividade enzimática em condições *in vitro* de oscilação de pH e ataque de enzimas presentes no estômago e intestino delgado de equinos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande disponibilidade de probióticos comerciais no Brasil não tem sido acompanhada por pesquisas que comprovaram cientificamente seus possíveis benefícios esperados, o que pode trazer confundimentos para os criadores de equinos quando estes buscarem estratégias nutricionais para melhoria do desempenho zootécnico de potros.

Como o Mangalarga Marchador apresenta acelerado desenvolvimento corporal até os seis meses de idade, uma outra forma de investigação dos possíveis efeitos benéficos dos probióticos em potros seria seu fornecimento para os animais antes dessa faixa etária, para melhor avaliação de seu desenvolvimento corporal e ósseo. Os probióticos auxiliariam na melhoria do aproveitamento da dieta, havendo possivelmente algum efeito no crescimento dos animais e na manutenção e/ou prevenção de distúrbios na microbiota digestiva. Portanto, uma estratégia a ser testada para obtenção de efeitos dos aditivos nutricionais testados sobre o desenvolvimento corporal dos potros seria sua inclusão nas dietas para éguas lactantes (Glade, 1991a,b) e/ou para potros lactentes dos três aos seis meses de idade.

A realização dos experimentos 2 e 3 confirmou a importância e necessidade de pesquisas sobre pré-requisitos necessários para utilização de probióticos e fitase exógena na espécie equina.

Como os probióticos testados nos potros Mangalarga Marchador eram dos mesmos fabricantes dos produtos avaliados no teste de viabilidade, pode-se verificar que a temperatura e tempo de estocagem utilizados durante o experimento 1 provavelmente permitiram a manutenção de células vivas nos produtos testados. No entanto, a utilização de probióticos que exigem sua estocagem em temperatura de refrigeração (4° C) pode ser um fator limitante para obtenção dos benefícios esperados com esse aditivo em criatórios brasileiros, especialmente quando localizados em regiões com condições ambientais quentes.

As dietas utilizadas para equinos no Brasil apresentam inclusão de grandes quantidades de cálcio e fósforo inorgânico, com relação Ca:P que varia de 2:1 a 3:1, e isso pode ser um fator inibidor para ação da fitase exógena. A interferência da microbiota digestiva equina sobre a estabilidade enzimática desse aditivo também deveria ser pesquisada, uma vez que a fitase pode ser degradada pelos microorganismos endógenos. Novas pesquisas *in vivo* são necessárias para confirmar a ação da fitase exógena na espécie equina, utilizando-se dietas com redução do fósforo inorgânico (Dunnett et al., 2009).

A produção de substâncias antagonistas *in vitro* pelas bactérias produtoras de ácido láctico testadas demonstrou potencial de utilização desses microorganismos na prevenção de diarreias causadas por *Salmonella* spp. e *E. coli* em equinos, sendo necessárias pesquisas *in vivo* para estudo de outros mecanismos relacionados com antagonismo (exclusão competitiva/efeito barreira e imunomodulação), incluindo a levedura *S. cerevisiae*. O desenvolvimento de animais gnotobióticos começou na virada do século XX, sendo a produção de ratos e camundongos isentos de germes (IG) estabelecida na década de 50. A técnica consiste na obtenção, manutenção e utilização de modelos animais dissociados de sua microbiota endógena (axênicos) ou associados intencionalmente com alguns poucos componentes conhecidos da própria microbiota da espécie (mono-, dixênicos, etc) ou de outras espécies animais (heteroxênicos). O animal IG é uma extrapolação do conceito de “cultura pura” tão utilizado em microbiologia, permitindo o estudo *in vivo* das características e capacidade dos microorganismos interagirem com seu hospedeiro. A gnotobiologia permitiria a realização de ensaios para avaliação de diversas combinações de microorganismos e contribuiria para seleção de probióticos mais específicos para controle de patógenos em equinos, por utilizar modelo animal mais acessível e com curto período experimental.

5. ANEXOS

Tabela 1. Precipitações pluviométricas do ano de 2006 na Fazenda Santa Helena, Montes Claros-MG

Mês	Precipitação (mm)
Janeiro	3,0
Fevereiro	237,0
Março	414,0
Abril	35,5
Maio	0
Junho	0
Julho	0
Agosto	5,0
Setembro	105,0
Outubro	192,0
Novembro	416,0
Dezembro	380,0
Total	1787,5

Tabela 2. Consumo diário de sal mineral dos potros durante o experimento

Mês	Quantidade (g/dia)
Abril 2006	11,91
Mai 2006	20,34
Junho 2006	45,26
Julho 2006	21,62
Agosto 2006	20,66
Setembro 2006	28,39
Outubro 2006	14,75
Novembro 2006	12,62
Média	21,94

O consumo diário de sal mineral dos potros (tabela 2) foi quantificado através do seguinte cálculo:

$$a) \text{ Consumo sal (g/dia)} = \frac{\text{PSal1} - \text{PSal2}}{\text{N}^{\circ} \text{ animais}} \times \text{N}^{\circ} \text{ dias}$$

Onde: PSal1 = peso do sal oferecido (g); PSal2 = peso das sobras de sal oferecido (g).

Tabela 3. Ganho médio diário de peso vivo dos animais utilizados no experimento (em kg/dia)

Dieta	Dias após desmame ^a						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	0,73 ± 0,15	0,69 ± 0,13	0,34 ± 0,10	0,40 ± 0,22	0,47 ± 0,12	0,52 ± 0,30	97,25
Leveduras	0,70 ± 0,05	0,80 ± 0,29	0,48 ± 0,16	0,32 ± 0,15	0,45 ± 0,23	0,47 ± 0,13	97,50
Bactérias e leveduras	0,62 ± 0,32	0,79 ± 0,24	0,46 ± 0,15	0,38 ± 0,09	0,42 ± 0,10	0,48 ± 0,15	96,25
Fitase	0,71 ± 0,11	0,54 ± 0,24	0,50 ± 0,11	0,39 ± 0,13	0,43 ± 0,09	0,38 ± 0,76	92,25
Média	0,69 ± 0,17	0,70 ± 0,23	0,44 ± 0,14	0,37 ± 0,14	0,44 ± 0,13	0,46 ± 0,18	95,81

CV = 31,64%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK (P>0,05)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 4. Ganho médio mensal de altura na cernelha dos animais utilizados no experimento (em cm/mês)

Dieta	Dias após desmame ^a						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	2,13 ± 1,11	2,00 ± 0,41	2,63 ± 0,85	3,13 ± 1,11	1,13 ± 0,75	1,88 ± 1,25	12,88
Leveduras	3,25 ± 1,55	2,75 ± 1,32	3,00 ± 1,08	2,25 ± 0,96	1,38 ± 1,11	2,38 ± 0,75	15,00
Bactérias e leveduras	2,13 ± 0,48	2,38 ± 0,85	2,88 ± 0,25	2,63 ± 1,38	1,50 ± 0,58	1,25 ± 0,65	12,75
Fitase	2,00 ± 1,22	2,63 ± 0,95	3,00 ± 0,91	2,25 ± 1,66	1,75 ± 0,96	1,75 ± 1,19	13,38
Média	2,38 ± 1,16	2,44 ± 0,89	2,88 ± 0,76	2,56 ± 1,22	1,44 ± 0,81	1,81 ± 0,98	13,50

CV = 30,90%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK (P>0,05)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 5. Ganho médio mensal de altura na garupa dos animais utilizados no experimento (em cm/mês)

Dieta	Dias após desmame ^a						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	2,25 ± 0,65	2,75 ± 0,65	2,00 ± 0,71	2,25 ± 1,71	1,88 ± 1,93	1,00 ± 0,71	12,13
Leveduras	2,88 ± 0,85	2,25 ± 1,32	2,75 ± 0,87	2,38 ± 1,25	1,25 ± 0,87	1,62 ± 0,85	13,13
Bactérias e leveduras	2,13 ± 0,75	2,63 ± 1,03	2,75 ± 0,50	2,13 ± 0,85	1,50 ± 1,08	1,38 ± 0,95	12,50
Fitase	2,50 ± 0,91	2,50 ± 1,22	3,00 ± 1,08	1,50 ± 1,47	1,75 ± 0,87	1,75 ± 0,29	13,00
Média	2,44 ± 0,77	2,53 ± 0,99	2,63 ± 0,83	2,06 ± 1,26	1,59 ± 1,16	1,44 ± 0,73	12,69

CV = 19,27%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK (P>0,05)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 6. Ganho médio mensal de comprimento corporal dos animais utilizados no experimento (em cm/mês)

Dieta	Dias após desmame ^a						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	3,38 ± 2,95	5,75 ± 2,10	4,25 ± 1,26	2,25 ± 1,76	2,50 ± 1,68	2,50 ± 1,41	20,63
Leveduras	3,13 ± 1,03	5,50 ± 1,96	4,00 ± 0,41	1,88 ± 0,75	3,38 ± 1,31	2,13 ± 1,84	20,00
Bactérias e leveduras	4,50 ± 1,47	3,63 ± 1,31	4,38 ± 1,75	2,00 ± 0,71	3,25 ± 1,32	2,38 ± 1,55	20,13
Fitase	5,30 ± 2,95	3,50 ± 3,34	2,75 ± 2,22	3,13 ± 2,39	3,25 ± 2,33	3,00 ± 0,91	20,93c
Média	4,08 ± 2,23	4,59 ± 2,32	3,84 ± 1,55	2,31 ± 1,49	3,09 ± 1,57	2,50 ± 1,35	20,42

CV = 34,68%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK (P>0,05)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 7. Ganho médio mensal de altura de costado dos animais utilizados no experimento (em cm/mês)

Dieta	Dias após desmame						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	1,38 ± 1,31	1,13 ± 0,85	1,13 ± 1,11	0,50 ± 1,00	1,38 ± 1,03	1,00 ± 0,41	6,50
Leveduras	1,50 ± 0,41	1,00 ± 0,91	1,25 ± 1,19	1,25 ± 0,65	0,50 ± 0,41	1,25 ± 0,65	6,75
Bactérias e leveduras	2,63 ± 1,31	1,13 ± 1,31	1,38 ± 0,48	1,00 ± 0,82	0,88 ± 1,03	0,50 ± 0,71	7,53
Fitase	0,83 ± 0,99	1,63 ± 0,63	2,25 ± 0,50	0,63 ± 0,48	0,13 ± 0,25	0,88 ± 0,63	6,33
Média	1,58 ± 1,17	1,22 ± 0,89	1,50 ± 0,91	0,84 ± 0,75	0,72 ± 0,84	0,91 ± 0,61	6,78

CV = 41,51%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK (P>0,05)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 8. Ganho médio mensal de perímetro torácico dos animais utilizados no experimento (em cm/mês)

Dieta	Dias após desmame ^a						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	5,98 ± 1,11	4,23 ± 2,01	1,08 ± 0,97	2,90 ± 1,54	3,03 ± 2,73	2,90 ± 1,66	20,10
Leveduras	6,75 ± 4,20	2,98 ± 3,85	4,33 ± 3,13	1,85 ± 1,92	2,20 ± 1,31	2,05 ± 1,24	20,15
Bactérias e leveduras	6,93 ± 1,26	5,38 ± 3,45	1,10 ± 1,31	0,73 ± 0,75	1,95 ± 1,39	1,88 ± 1,36	17,95
Fitase	6,60 ± 3,52	2,90 ± 1,00	3,23 ± 1,65	1,70 ± 1,14	1,80 ± 1,04	2,33 ± 1,88	18,55
Média	6,56 ± 2,59	3,87 ± 2,73	2,43 ± 2,26	1,79 ± 1,49	2,24 ± 1,63	2,29 ± 1,45	19,19

CV = 40,07%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK (P>0,05)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 9. Ganho médio mensal de perímetro de canela dos animais utilizados no experimento (em cm/mês)

Dieta	Dias após desmame ^a						Ganho total no período
	30	60	90	120	150	180	
Controle	0,20 ± 0,23	0,30 ± 0,41	0,35 ± 0,33	0,23 ± 0,26	0,10 ± 0,08	0,35 ± 0,24	1,53
Leveduras	0,30 ± 0,32	0,30 ± 0,23	0,7 ± 0,16	0,33 ± 0,46	0,15 ± 0,13	0,28 ± 0,22	2,05
Bactérias e leveduras	0,38 ± 0,43	0,30 ± 0,22	0,43 ± 0,40	0,30 ± 0,32	0,28 ± 0,29	0,10 ± 0,14	1,78
Fitase	0,23 ± 0,39	0,48 ± 0,43	0,35 ± 0,17	0,48 ± 0,43	0,15 ± 0,17	0,18 ± 0,17	1,85
Média	0,28 ± 0,32	0,34 ± 0,31	0,46 ± 0,30	0,33 ± 0,35	0,17 ± 0,18	0,23 ± 0,20	1,80

CV = 71,15%

Não houve diferença significativa entre dietas e meses de avaliação pelo teste SNK ($P > 0,05$)

^aDesmame aos 173 ± 8 dias de idade

Tabela 10. Valores de referência para concentrações séricas de cálcio, fósforo e magnésio em equinos, segundo diversos autores

Autores	Cálcio	Fósforo	Magnésio
Concentração sérica (mg/dL)			
Kaneko et al (2008)	11,2 - 13,6	3,1 - 5,6	2,2 - 2,8
Garcia Lopez (2001), citado no Nutrients... (2007)	10,8 - 13,5	-	-
Rezende (1997) ^a	9,21 - 10,42	6,22 - 8,88	1,55 - 1,76
Meyer, Coles e Rich (1995)	11,2 - 13,6	5,0 - 6,0 ^b	-
Bauer et al. (1984) ^c	12,8 ± 1,0	4,7 ± 0,8	-
Meyer e Ahlswede (1977), citado no Nutrients... (2007)	-	-	1,6 - 2,0
Meyer (1963), citado por Wolter (1975)	9,0 - 13,0	-	1,8 - 2,5

^aPotros de 1,5 a 12 meses de idade.

^bPotros de 6 a 12 meses de idade.

^cPotros do nascimento aos 12 meses de idade.

6. Referências bibliográficas

- ABDOULI, H.; BEN ATTIA, S. Evaluation of two-stage *in vitro* technique for estimating digestibility of equine feeds using horse faeces as the source of microbial inoculum. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 132, p. 155-162, 2007.
- ABRÃO, F.O.; BARRETO, S.M.P.; GERASSEV, L.C. et al. Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.3, p.757-760, 2010.
- ADEBIYI, O.A.; OLOGHOB, A.D.; AGBOOLA, A.S. Effects of microbial phytase supplementation on mineral composition of tibia and mineral utilization in broiler fed maize - based diets. *International J. Poultry Sci.*, v. 8, n. 6, p. 570-573, 2009.
- AKIN, D.E. Association of rumen fungi with various forage grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.16, n.4, p. 273-285, 1987.
- ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 39, p. 119-129, 2010 (supl. especial).
- ANKUR, T.; ANIL, K.P.; GUNJAN, G. et al. In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. *Arch. Anim. Nutr.*, v.60, p.412-417, 2006.
- ARGENZIO, R.A. Functions of the equine large intestine and their interrelationship in disease. *Cornell Veterinary*, v.65, p. 303-330, 1975.
- ASSUENA, V.; JUNQUEIRA, O.M.; DUARTE, K.F. et al. Effect of dietary phytase supplementation on the performance, bone densitometry, and phosphorus and nitrogen excretion of broilers. *Brazilian J. Poultry Sci.*, v.11, n.1, p. 25 – 30, 2009.
- BAUER, J.E.; HARVEY, J.W.; ASQUITH, R.L. et al. Clinical chemistry reference values of foals during the first year of life. *Equine Vet. J.*, v.16, n.4, p.361-363, 1984.
- BEDFORD, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 86, p. 1-13, 2000.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, v.70, n.2, p. 567-590, 1990.
- BERTONE, A.L.; PARK, R.D.; TURNER, A.S. Periosteal transection and stripping for treatment of angular limb deformities in foals: radiographic observations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 187, n.2, p. 153-156, 1985.
- BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J. Zhejiang University SCIENCE B*, v. 9, n. 3, p. 165-191, 2008.
- BONHOMME, A. Attachment of horse cecal bacteria to forage cell walls. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v. 48, n.2, p. 313-322, 1986.
- BORTONI, R.F. *Mangalarga Marchador e os outros cavalos de sela no Brasil*. Uberaba: Grupo Total Ltda, 1991. 190p.
- BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A. et al. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, p.564-568, 1998.
- BRANDI, R.A.; FURTADO, C.E. Importância nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.38, p. 246-258, 2009 (supl. especial).

- CABRAL, G.C.; ALMEIDA, F.Q.; AZEVEDO, P.C.N. et al. Avaliação morfométrica de equinos da raça Mangalarga Marchador: medidas angulares. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, n.6, supl. 1, p.1790-1797, 2004a.
- CABRAL, G.C.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. et al. Avaliação morfométrica de equinos da raça Mangalarga Marchador: medidas lineares. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 33, n. 4, p. 989-1000, 2004b.
- CABRAL, G.C.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. et al. Avaliação morfométrica de equinos da raça Mangalarga Marchador: índices de conformação e proporções corporais. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, n.6, supl. 1, p.1798-1805, 2004c.
- CAMARGO, M.X.; CHIEFFI, A. *Ezoognózia*. São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1971. 320 p.
- CARON, J.P. Angular limb deformities in foals. *Equine Vet. J.*, v. 20, n. 3, p. 225-228, 1988.
- CARROL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet. J.*, v. 20, n. 1, p. 41-45, 1988.
- CARVALHO, R.T.L.; HADDAD, C.M. *Pastagens e alimentação de equinos*. Piracicaba: FEALQ, 1987. 85p.
- CHU, G.; KOMORI, M.; HATTORI, R. et al. Dietary phytase increases the true absorption and endogenous fecal excretion of zinc in growing pigs given a corn-soybean meal based diet. *Anim. Sci. J.*, v. 80, p. 46-51, 2009.
- COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
- COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; RESENDE, A.S.C. et al. Caracterização demográfica da raça Mangalarga Marchador. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.272-280, 2005.
- CUNNIFF, P. (Ed.) Official methods of AOAC International. 16. ed. Arlinton: AOAC International, v.1, 1995. 1025p.
- DALY, K.; STEWART, C.S., FLINT, H.J. et al. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecology*, v.38, p. 141-151, 2001.
- DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHET, A.-G. et al. Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. *Anim. Sci.*, v. 77, n. 2, p. 293-304, 2003.
- DESROCHERS, A.M.; DOLENTE, B.A.; ROY, M.F. et al. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* for treatment of horses with acute enterocolitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 227, p. 954-959, 2005.
- DUNNETT, C.; DUNNET, M.; McLACHLAN, F.K. The effect of a feed ingredient with endogenous phytase activity on phosphorus availability in equine diets. In: LINDNER, A. *Equine Nutrition and Training Conference*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, p. 177-189, 2009.
- EZENDAM, J.; VAN LOVEREN, H. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutr. Rev.*, v.64, n.1-14, 2006.
- GUIDELINES for the Evaluation of Probiotics in Food. London: FAO/WHO Expert Consultation, 2002. 11p.
- FREY, K.S.; POTTER, G.D.; ODOM, T.W. et al. Plasma silicon and radiographic bone density in weanling Quarter Horses fed sodium zeolite A. *Equine Vet. Sci.*, v.12, n.5, p.292-296, 1992.
- FRONTELA, C.; ROS, G.; MARTÍNEZ, C. Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v. 58, n.3, p. 215-220, 2008.
- FU, S.; SUN, J.; QIAN L. Effect of Ca²⁺ on Beta-Propeller Phytases. *Protein & Peptide Letters*, v.15, p.39-42, 2008.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacteriology*, v.66, p.365-378, 1989.

- FURTADO, C.E.; BARBOZA, E.D.; BRANDI, R.A. et al. Uso de levedura em equinos alimentados com dietas compostas de fenos de diferentes qualidades nutricionais. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.10, p.2194-2199, 2010.
- FURUYA, S.; SAKAMOTO, K.; TAKAHASHI, S. A new *in vitro* method for the estimation of digestibility using the intestinal fluid of the pig. *Br. J. Nutr.*, v. 41, p. 511-520, 1979.
- GARDNER, A. L. *Técnicas de pesquisa em pastagens e aplicabilidade de resultados em sistemas de produção*. Brasília: II CA / Embrapa, 1986. 197p.
- GLADE, M.J. Dietary yeast culture supplementation of mares during late gestation and early lactation – Effects on milk production, milk composition, weight gain and linear growth of nursing foals. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 11, n. 2, p.89-95, 1991a
- GLADE, M.J. Effects of dietary yeast culture supplementation of lactating mares on the digestibility and retention of the nutrients delivered to nursing foals via milk. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 11, n. 6, p.323-329, 1991b
- GLADE, M.J.; SIST, M.D. Supplemental yeast culture alters the plasma amino acid profiles of nursing and weaning horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 10, p. 369-379, 1990.
- GONÇALVES, R.W.; MAIA, T.L.; LEITE, J.R.A. et al. Caracterização de equinos da raça Mangalarga Marchador criados na região de Montes Claros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009. Maringá, *Anais...* Maringá: 2009. 3p.
- HAINZEA, M.T.M.; MUNTIFERING, R.B.; WOOD, C.W. et al. Faecal phosphorus excretion from horses fed typical diets with and without added phytase. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.117, p. 265-279, 2004.
- HEUSNER, G.L. Effect of month of birth on the size of foals. *Equine Vet. Sci.*, v.12, n.5, p.297-300,1992.
- HILL, J.; GUTSELL, S. Effect of supplementation of a hay and concentrate diet with live yeast culture on the digestibility of nutrients in 2 and 3 year old riding school horses. *Proceed. Brit. Soc. Anim. Sci.*, v.7, p.128, 1998.
- HINTZ, H.F. Effect of energy and protein deprivation on bodyweight and height gains of young horses. *Equine Practice*, v. 14, n. 1, p.7-8, 1992.
- HINTZ, H.F.; CYMBALUK, N.F. Nutrition of the horse. *Annu. Rev. Nutr.*, v.14, p. 243-267, 1994.
- HOFER, E.; ZAMORA, M.R.N.; LOPES, A.E. et al. Sorovares de *Salmonella* em carne de equídeos abatidos no nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 2, p. 80-84, 2000.
- HOOPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.*, v.22, p. 283-307, 2002.
- HULL, R. R.; CONWAY, P. L.; EVANS, A. J. Probiotic foods – a new opportunity. *Food Aust.*, v. 44, n.3, p. 112 – 113, 1992.
- JELAN, Z.A.; JEFFCOTT, L.B.; LUNDEHEIM, N. et al. Growth rates in Thoroughbred foals. *Pferdeheilkunde*, v. 12, n. 3, p. 291-295, 1996.
- JOUANY, J.P.; MEDINA, B.; BERTIN, G. et al. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and high-starch diet and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J. Anim. Sci.*, v.87, p. 2844-2852, 2009.
- JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L. et al. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, n.8, p. 3738 – 3741, 1999.
- JULLIAND, V.; RIONDET, C.; DE VAUX et al. Identification of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v. 70,p. 161 – 168, 1998.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 916p

- KERN, D. L.; SLYTER, L. L.; LEFFEL, E. C. et al. Ponies vs. steers: microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. *J. Anim. Sci.*, v. 38, n.3, p. 559 – 563, 1974.
- KIM, S. M.; KIM, C. M.; LEE, H. K. et al. Evaluation of nutrient values of some feedstuffs, and the effects of yeast culture supplementation on digestibilities of nutrients and blood parameter in horse. *Korean J. Anim. Nut. Feed.*, v.15, n.5, p.272-280, 1991.
- KONIETZNY, U.; GREINER, R. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35, p.11-18, 2004.
- LEWIS, L. D. *Nutrição clínica equina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000. 710 p.
- LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. *Estudo do complexo do agronegócio cavalo*. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2006. 256p. (Relatório Final)
- LIN, C.; STAHL, D.A. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p. 1348-1351, 1995.
- LIU, J.; LEDOUX, D.R.; VEUM, T.L. *In vitro* procedure for predicting the enzymatic dephosphorilation of phytase in corn-soybean meal diets for growing swine. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, n. 7, 1997.
- LOPES, J. B.; FURTADO, C. E.; VITTI, D. M. S. S. et al. Metabolismo do Fósforo em Equinos. 1. Avaliação Dietética de Diferentes Fontes de Fósforo. *Rev. Bras. Zootec.*, v.32, n.6, p.1339-1347, 2003.
- LOSADA, M.A.; OLLEROS, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutr. Res.*, v.22, n.1-2, p.71-84, 2002.
- MACZULAK, A.E.; DAWSON, K.; BAKER, J.P. Nitrogen utilization in bacterial isolates from the equine cecum. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 50, n. 6, p. 1439-1443, 1985.
- MAIA, O.M.; DUARTE, R.; SILVA, A.M. et al. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enteric* subsp. *enteric* ser. Typhimurium. *Vet. Microbiol.*, v. 79, p. 183-189, 2001.
- MARTINS, F.S.; NEVES, M.J.; ROSA, C.Q. et al. Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*. Disponível em: <http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2956> Acessado em: 16 out 2008a.
- MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.C.P.; TIAGO, F.C.P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 95 reduces the translocation of *Salmonella enteric* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and convencional mice. *J. Med. Microbiol.*, v. 56, p. 352-359, 2007.
- MARTINS, F.S.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R. et al. Efeito do método de conservação, naviabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos a base de leveduras. Disponível em: <http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2956> Acessado em: 16 out 2008b.
- MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E. et al. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J. Anim. Sci.*, v. 80, n. 5, p. 2600 – 2609, 2002.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. *Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico*. São Paulo: Roca, 1995. 308p.
- MONTES, A. J.; PUGH, D. G. The use of probiotics in food-animal practice. *Vet. Med.*, v. 88, n. 3, p. 282 – 288, 1993.
- MOORE, B. E.; NEWMAN, K. E.; SPRING, P. et al. Yea-Sacc¹⁰²⁶: Cecal fermentation in the horse. Effect of yeast culture (Yea-Sacc¹⁰²⁶) on microbial populations and digestion in the cecum and colon of the equine. *J. Anim. Sci.*, v. 72, Suppl. 1, p. 252 - 253, 1994.

- MOROTOMI, M.; YUKI, N.; KADO, Y. et al. Lactobacillus equi sp. nov., a predominant intestinal Lactobacillus species of the horse isolated from faeces of healthy horses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.52, p. 211–214, 2002.
- MOURA, R.S.; REZENDE, A.S.C.; SALIBA, E.O.S. et al. Digestibilidade aparente de dietas suplementadas com probióticos o fitasa para potros Mangalarga Marchador. *Arch. Zootec.*, 2010 (no prelo).
- MOURA, R.S.; REZENDE, A.S.C.; SALIBA, E.O.S. et al. Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 38, n.6, p. 1045-1050, 2009.
- NAKASHIMA, B.A.; McALLISTER, T.A.; SHARMA, R. et al. Diversity of Phytases in the Rumen. *Microbial Ecology*, v. 53, p. 82–88, 2007.
- NAOUM, P.C. *Eletroforese. Técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Santos, 1990. 174p.
- NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CARVALHO, M.A.R. et al. antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a Lactobacillus sp. Isolated from the rat fecal microbiota. *Anaerobe*, v. 5, p. 409-411, 1999.
- NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; McINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast Saccharomyces cerevisiae as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.*, v.76, p.249-261, 1996.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; PENNA, F.J. et al. Probióticos: Experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F. (Ed.) *Prebióticos e Probióticos – Atualizações e Prospecção*. Viçosa: UFV, 2003, p. 123-133, 2003.
- NORDMO, R. Beta-glucans: immunomodulatory actions in domestic animals. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1, 2009. Campinas. *Anais...* Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p.117-118, 2009.
- NORMAIS climatológicas – Série 1961/1990. Departamento Nacional de Meteorologia. Brasília: Serviço de Produção de Informação/EMBRAPA, 1992. 84p.
- NUTRIENTS requirements of horses. 5 ed. Washington: National Academy of Science, 1989, 100p.
- NUTRIENTS requirements of horses. 6 ed. Washington: National Academy of Science, 2007, 341p.
- PAGAN, J. D. Effect of yeast culture supplementation on nutrient digestibility in mature horses. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p.371, 1990. (Supplement)
- PAGAN, J.D.; JACKSON, S.G.; CADDEL, S. A summary of growth rates of thoroughbreds in Kentucky. *Pferdeheilkunde*, v. 12, n. 3, p. 285-289, 1996.
- PARRAGA, M. E.; SPIER, S. J.; THURMOND, M. et al. A clinical trial of probiotic administration for prevention of Salmonella shedding in the postoperative period in horses with colic. *J. Vet. Internal Med.*, v.11, n.1, p.36-41, 1997.
- PATTERSON, D.P.; COOPER, S.R.; FREEMAN, D.W. et al. Effects of varying levels of phytase supplementation on dry matter and phosphorus digestibility in horses fed a common textured ration. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 22, p.456-459, 2002.
- PÉREZ-SOTELO, L.S.; TALAVERA-ROJAS, M.; MONROY-SALAZAR, H.G. et al. In vitro evaluation of the binding capacity of Saccharomyces cerevisiae Sc47 to adhere to the wall of Salmonella spp. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v. 47, n. 3-4, p. 70-75, 2005.
- PHYTASE... Products for Animal Nutrition, s/ local: BASF, 2005. 2p. (Technical Information)
- PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. et al. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise de componentes principais. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 34, n. 2, p. 589-599, 2005a.
- PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. et al. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise discriminante. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 34, n. 2, p. 600-612, 2005b.

- POPOFF, M.Y. Antigenic formulas of *Salmonella* serovars. who collaborating centre of reference research on *Salmonella*. Paris: Institut Pauster, 2001.
- PORUBCAN, R. S. Probiotics in the 1990s. *The Compendium*, v. 12, n. 9, p. 1353-1359, 1990.
- RABOY, V. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*, v. 64, p. 1033–1043, 2003.
- RAMOS, L.C.V.O.; FERREIRA, W.M.; GONÇALVES, L.C. et al. I, F.J. Hidroxiprolina e fosfatase alcalina como parâmetros fisiológicos indicadores do status metabólico do cálcio e do fósforo em equinos. *Rev. Acad.*, v. 5, n. 4, p. 359-368, 2007.
- REZENDE, A. S. C; VELOSO, J.A.F.; VAL, L.C. et al. Efeito de nível do concentrado suplementar sobre o crescimento de potros pós-desmama. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.38, n.6, p.927-941, 1986.
- REZENDE, A.S.C. *Efeito de dois diferentes programas nutricionais sobre o desenvolvimento corporal e a ocorrência de alterações ortopédicas em potros Mangalarga Marchador*. 1997.171f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- REZENDE, A.S.C.; SAMPAIO, I.B.M.; LEGORRETA, G.L. et al. Efeito de dois diferentes programas nutricionais sobre o desenvolvimento corporal de potros Mangalarga Marchador. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, n.2, p. 495-501, 2000a.
- REZENDE, A.S.C.; SAMPAIO, I.B.M.; LEGORRETA, G.L. et al. Effect of two different nutritional programs on orthopedic alterations in Mangalarga Marchador foals. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 20, n.10, p. 651-656, 2000b.
- RIBEIRO, D.B. *O cavalo de raças, qualidade e defeitos*. Rio de Janeiro: Globo Rural, 1993. 290p.
- ROBERFROID, M.B.; BORNET, F.; BOULEY, C. et al. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition Reviews*, v. 53, n.5, p. 127-130, 1995.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SAASTAMOINEN, M. Factors affecting growth and development of foals and young horses. *Acta Agric. Scand.*, v. 40, p. 387-396, 1990a.
- SAASTAMOINEN, M. Heritabilities for body size and growth rate and phenotypic correlations among measurements in young horses. *Acta Agric. Scand.*, v. 40, p. 377-386, 1990b.
- SAEG. *Sistema de análises estatísticas e genéticas (versão 8.0)*. UFV, 2000.
- SALIBA, E.O.S.; OLIVEIRA, M.C.; FARIA, E.P. Avaliação da concentração de amido na raiz de genótipos de mandioca através das técnicas enzimáticas, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIV) e análise particular por difração a laser (Partica). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009. Maringá, *Anais...* Maringá: PR-UEM, 2009. 3p.
- SANTOS, E.M.; ALMEIDA, F.Q.; VIEIRA, A.A. et al. Lactação em éguas da raça Mangalarga Marchador: produção e composição do leite e ganho de peso dos potros lactentes. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, n.2, p.627-634, 2005.
- SAVAGE, D.C. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, v.6, p. 155-178, 1986.
- SCHRYVER, H.G.; HINTZ, H.F.; GRAIG, P.H. et al. Site of phosphorus absorption from the intestine of the horse. *J. Nutr.*, v.102, n.1, p.143-148, 1972.
- SELLE, P.H. A; COWIESON, A.J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate for poultry and pigs. *Livestock Sci.*, v. 124, p. 126-141, 2009.
- SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.28, p.405-440, 2004.

- SERVIN, A.L.; COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v.17, p.741-754, 2003.
- SILVA, S.H.; VIEIRA, E.C.; DIAS, R.S. et al. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. *J. Med. Microbiol.*, v. 50, p. 161-164, 2001.
- SILVEIRA, J. M. *Patologia clínica veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 196 p.
- SILVERSIDES, F. G.; HRUBY, M. Feed formulation using phytase in laying hen diets. *J. Applied Poultry Res.*, v. 18, p. 15-22, 2009.
- SIMMONS, H.A.; FORD, E.J. Gluconeogenesis from propionate produced in the colon of the horse. *Brit. Vet. J.*, v.147,p.340-345, 1991.
- SIMONS, P.C.M.; VERSTEEGH, H.A.J. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.*, v. 64, n. 2, p. 525-540, 1990.
- SINGH, P.K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. *World's Poultry Sci. J.*, v. 64, p. 553-580, 2008.
- SISSONS, J. W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhea and promote digestion in farm animals – a review. *J. Sci. Food Agric.*, v. 49, n. 1, p. 1 – 13, 1989.
- STAPPENBECK, T.S.; HOOPEN, L.V.; GORDON, J.I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, n.24, p. 15451-15455, 2002.
- TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T. et al. Rumen bacterial diversity as determined by analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol. Ecology*, v.29, p.159-169, 1999.
- TUGBA BINGOL, N.; AKIF KARSLI, M.; BOLAT, D. et al. Effects of microbial phytase on animal performance, amount of phosphorus excreted and blood parameters in broiler fed low non-phytate phosphorus diet. *Asian J. Anim. Vet. Advances*, v. 4, n. 3, p. 160-166, 2009.
- UMA RAÇA brasileira. Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador. Disponível em: <<http://desenvolvimento.abccmm.org.br/historial.asp>> Acessado em 15 set 2010.
- VALENTE, S.S.; SANTIAGO, G.S.; FERREIRA, W.M. et al. Performance of growth rabbits fed diets with enzymatic supplementation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 52, n. 2, p. 173-177, 2000.
- VAN DER WIELEN, P.W.J.J.; BIESTERVELD, S.; NOTERMANS, et al. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n.6, p. 2536-2540, 2000.
- VAN DOORN, D.A.; EVERTS, H.; WOUTERSE, H.; BEYNEN, A.C. The apparent digestibility of phytase phosphorus and the influence of supplemental phytase in horses. *J. Anim. Sci.*, v.82, p.1756-1763, 2004.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, v. 74, n. 10, p. 3583 – 3597, 1991.
- VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Anim. Nutr.*, v. 40, n.7, p. 543 – 567, 1990.
- VASCONCELOS, F.O.; GODOI, F.N.; TORAL, F.L.B. et al. Efeitos genéticos e de ambiente sobre parâmetros da curva de crescimento de equinos da raça Brasileiro de Hipismo e mestiços. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO GENÉTICO, 8, 2010. Maringá, *Anais...* Maringá: 2010. 3p.
- WARD, M.P.; ALINORI, C.A.; COUETIL, L.L. et al. A randomized clinical Trial using probiotics to prevent *Salmonella* fecal shedding in hospitalized horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 24,p.242-247, 2004.

- WEESE, J.S. A review of probiotics: are they really “functional foods”? *AAEP Proceedings*, v. 47, p. 27-31, 2001.
- WEESE, J.S.; ANDERSON, M.E.; LOWE, A. et al. Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 351-355, 2004.
- WEESE; J.S.; ROUSEAU, J. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 226, p. 2031-2034, 2005.
- WILSON, K.H.; BLITCHINGTON, R.B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, n.7, p.2273-2278, 1996.
- WHITELEY, L.O.; PURDON, M.P.; RIDDER, G.M. et al. The interactions of diet and colonic microflora in regulating colonic mucosal growth. *Toxicol. Pathol.*, v.24, n.3, p. 305-314, 1996.
- WOLTER, R. *Alimentación del caballo*. Zaragoza: Acribia, 1975. 172p.
- YUKI, N.; SHIMAZAKI, T.; KUSHIRO, A. et al. Colonization of the stratified squamous epithelium of the non-secreting area of horse stomach by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.5030–5034, 2000.
- YUYAMA, T.; YUSA, S.; TAKAI, S. et al. Evaluation of a host-specific Lactobacillus probiotic in neonatal foals. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, v.2, n.1, p. 26-33, 2004.

