JOÃO PAULO FERNANDES SANTOS

Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos

Pirassununga

2015

JOÃO PAULO FERNANDES SANTOS

Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto

De acordo:

Orientador

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3157
FMVZ

Santos, João Paulo Fernandes

Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos / João Paulo Fernandes Santos. -- 2015.
90 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto.

1. Felinos. 2. Nutrição. 3. Prebióticos. 4. Saúde Intestinal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos", protocolado sob o nº 2734/2012, utilizando 14 (quatorze) gatos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Effects of levels of dried yeast wall on digestibility, fecal microbiota and fermentation products in diets for adults cats", protocol number 2734/2012, utilizing 14 (fourteen) cats, under the responsibility Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

fone: +55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, João Paulo Fernandes

Título: **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Se você pensa que é um derrotado, Você será derrotado.
Se não pensar “quero a qualquer custo”, não conseguirá nada.
Mesmo que você queira vencer, mas se pensa que não vai conseguir,
A vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,
você será um fracassado.
Nós descobrimos neste mundo que o sucesso começa pela nossa intenção
e tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malogrado,
você o será.
Se você almeja atingir uma posição mais elevada
deve, antes de obter a vitória, dotar-se da convicção de que conseguirá
Infalivelmente.

A luta pela vida, nem sempre é vantajosa;
Nem aos fortes, nem aos espertos.
Mais cedo ou mais tarde,
quem cativa a vitória é aquele que crê plenamente:
Eu conseguirei.”

Napoleon Hill

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Nilce Fernandes de Andrade Santos e Carlos Oliveira dos Santos pelo amor e dedicação.

Ao meu tio Paulo Oliveira dos Santos (in memoriam) e meu avô João Oliveira dos Santos (in memoriam) por todos os ensinamentos e presença contínua em minha vida.

Ao Raphael César Cortazzo pelo carinho e auxílio em todos os projetos.

“O gato é uma lição diária de afeto verdadeiro e fiel. Suas manifestações são íntimas e profundas. Exigem recolhimento, entrega e atenção.”

Artur da Távola

“Um miau massageia o coração.”

Stuart Mcmillan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as bênçãos. Ao meu anjo da guarda, Orixá, mentor espiritual ou subconsciente, eu desconheço qual a força me guia, mas sei que todos meus passos veem sendo constantemente acompanhado com luz e coragem.

Aos meus pais, Carlos Oliveira dos Santos e a Nilce Fernandes de Andrade Santos, por todo carinho, amor e dedicação em minha educação, os quais foram seguidos de renúncias. O homem que sou hoje se trata de uma obra delicadamente “construída” por estes maravilhosos indivíduos, que de forma singular souberam dosar amor, respeito e rigor, com transmissão de valores para uma vida respeitosa e honesta.

Aos meus irmãos, Marco Antonio Fernandes Santos e Maria Paula Fernandes Santos. Ao Marco pelos auxílios e à Maria Paula por ser um anjo enviado por Deus para alegrar nossas vidas, a qual consegue tirar-me um sorriso mesmo nos momentos mais estressantes.

Aos meus avós João Oliveira dos Santos (*in memorian*) e Emília Maria dos Santos, ao meu *tio-pai* Paulo Oliveira dos Santos (*in memorian*) e minhas *tias-mães* Marinalva, Clarice, Florisvalda e Fátima, os quais me proporcionaram os melhores finais de semana da toda a minha infância, e foram personagens de grande importância na minha educação.

Ao Raphael César Cortazzo por todo o auxílio neste período, pela compreensão e paciência durante toda a minha jornada acadêmica. Pelas trocas constantes, que me fizeram amadurecer e enxergar muitas vezes o que estava nublado ou mal desenhado em minha mente.

À Universidade de São Paulo, na pessoa do reitor Prof. Dr. Marco Antonio Zago, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, na pessoa do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pela oportunidade e acolhimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo Fapesp 2012/12730-0). A concessão da bolsa foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, sem tal apoio com certeza eu não conseguiria chegar neste momento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto, o qual foi extremamente importante na minha formação profissional e pessoal. Pela confiança, amizade, paciência, disponibilidade e oportunidade. Serei eternamente grato por todas as lições. Meu Muito Obrigado!

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal, em nome do Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, por acreditar em mim e apostar em uma pré-orientação, bem como ao Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

A todos os docentes do Departamento de Nutrição e Produção Animal, os quais foram singulares no processo de ensino-aprendizagem e extremamente enriquecedores para minha formação. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos, com importante carinho ao Prof. Dr. Augusto Hauber Gameiro, Profa. Dra. Maria de Fátima Martins e Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

Ao Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, por possibilitar a utilização de sua estrutura de pesquisa para condução deste estudo.

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal que sempre foram tão gentis, em especial ao João Paulo de Oliveira Barros, Alessandra de Cassia Terassi da Silva, Fábila Silene Iadrozza, Renata Maria Consentino Conti, Simi Luiza Durante Aflalo, Lucinéia Mestieri, Ari Luiz de Castro e Gilson Luiz Alves de Godoy.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, principalmente ao Abelardo Cecílio de Souza, Geraldo e Elias pela atenção e auxílios imprescindíveis durante a condução do estudo, os quais foram atenciosos e extremamente prestativos comigo e com os animais, bem como as técnicas: Clara Satsuki Mori, Cláudia Regina Stricagnolo e Samantha Ives Miyaishiro.

Às Profas. Dra. Márcia de Oliveira Gomes Sampaio e Dra. Janine França, as quais realizaram valiosas contribuições em minha banca de qualificação, e sempre foram extremamente solícitas e gentis.

Ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi pela atenção e auxílio na produção das dietas experimentais em sua estrutura experimental.

À Profa. Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória e todos os membros do Laboratório de Bioquímica dos Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, pela disponibilidade e auxílio com as determinações de aminos biogênicos.

Ao Prof. Dr. Mario Julio de Avila-Campos e todos os membros do Laboratório de Bacteriologia de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por me apresentarem de forma mais estruturada o maravilhoso mundo das bactérias, por todo auxílio nas análises de microbiologia, gentileza e ensinamentos.

À Profa. Dra. Catarina de Abdalla Gomide e Profa. Dra. Valquíria Cação Cruz-Polycarpo, pela confiança e oportunidades, as quais serei eternamente grato.

À Universidade Federal de Lavras, seus grandes mestres, com especial agradecimento à Profa. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, quem me apresentou à Pesquisa, me orientou durante meu mestrado em um “treinamento” que sempre foi muito além dos muros da Universidade, que com uma capacidade descomunal, inteligência e rigor soube conduzir seus discípulos para entrega-los à vida profissional, equipe (NENAC – Núcleo de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia) da qual me orgulho de ter feito parte e sempre estará em meu coração, em especial à Carolina Padovani Pires, Natália Charleaux Roque, Ana Flávia Chizzotti, Bárbara Carriel Benitez, Janine França, Lívia Geraldi Ferreira, Jéssica Santana dos Reis, Rosana Cláudio Silva Ogoshi e Bruna Ponciano Neto, agradeço a vocês pelo profissional que tenho me tornado. O colorido da vida é o encontro de grandes amigos e aqueles que se tornam irmãos de alma. A distância existirá, mas o sentimento será sempre o mesmo.

Aos membros do GENP (Grupo de Estudos em Nutrição Pet) pela possibilidade de trocas de experiências e conhecimentos. Todos os momentos juntos sempre foram muito alegres e enriquecedores. Agradeço a todos, em especial às amigas Brunettes (Patricia Massae Oba, Laura Fantucci de Oliveira Matheus, Mariane Ceschin Ernandes e Livia Rosa Folconi) e a “agregada” Fernanda Sant Anna Kroll, pois vocês foram e sempre serão muito importantes para mim. Obrigado pelas oportunidades.

Aos amigos Eduardo Braghirolli Zanelli e Dóris Pereira Halfen. Vocês foram essenciais neste processo, com humor, sarcasmo e fidelidade sempre tornaram o ambiente muito mais divertido e agradável.

A todos os meus docentes da graduação, principalmente Dra. Thalita Oliveira Cucki, Dr. Rubén Roberto Velazco Gutierrez, Dra. Silvia Robles e Me. José César Varoli Junior e Me. Luciano Eduardo Polaquini, os quais com sua dedicação tem grande importância no profissional que sou hoje. E aos amigos Thiago Belo Ferreira, Filipe Ferreira Pinto e Tabatha Lacerda.

À Adriana Augusto Aquino, não apenas por todo o auxílio na condução deste estudo, o qual foi fundamental, mas por ter uma grande importância na minha vida, grande parte de toda minha história na pesquisa devo a você. Pelos incentivos, brigas e choros, tudo foi e sempre será intenso! Obrigado Dri!

Ao André Dechen, acredito e sempre acreditarei que devemos respeitar e torcer para que nossos estagiários tenham um futuro brilhante. Afinal indireta e discretamente somos responsáveis pelo que eles se tornam, seja na carreira profissional ou não, pois o mais importante é que consigamos passar experiências para a vida. Se este trabalho hoje está concluído muito te agradeço André.

Aos amigos de Pós-Graduação que me acompanharam nesta jornada. Muitas pessoas compartilharam seus processos de formação comigo e agregaram valor a minha pessoa. Seria injusto nomeá-los, com o risco de negligenciar alguém, no entanto nesta fase específica, não posso deixar de destacar a Paula Adriana Piccolo Pieruzzi, Gustavo do Valle Polycarpo, Julio Dadalt e Romulo Germano. Deixo aqui meu Muito Obrigado a vocês e todos os amigos ou colegas de Pós-Graduação.

Aos amigos André Prazeres, Maíra Lucone, Luiz Ortega, Aline Pedrosa, Sandra Rodrigues, Adeone, Fábio, Eliane, Francisco e Mário Kokuta (Konig do Brasil Ltda.), que de forma muito gentil me enriqueceram com experiências profissionais, em um período muito especial que passei entre o fim do Mestrado e o início do Doutorado.

Aos grandes amigos Livia Gossi, Sheila Viana, Karina Messias, Karina Hottes, Adam Tavares, Felipe Santos, Suzana Vaz Carvalho e Lucy Cortazzo, pois sem nem entenderem o que era mananoligossacarídeos, *Campylobacter jejuni* e outras coisas presentes neste trabalho sempre foram um grande porto seguro para os momentos de angústias.

Aos meus cães, pois o amor puro e verdadeiro emana deles. A Godiva, meu presente de Deus, ao Borges um anjo em quatro patas, a Stellinha que esteve ao pé durante muitas e muitas noites enquanto escrevia e a doce Pietra. Bem como meus anjinhos que estarão sempre em meu coração, Vida e Tin (*in memoriam*), que me deixaram ao longo da jornada acadêmica.

Agradeço por fim, mas não menos importante a todos os gatos (Gorda, Peluda, Brenda, Bufo, Clara, Fumaça, Tchesko, Pretinho, Ulisses, Ricota, Linguíça, Yuri, Giovanni, Veludo, Marmota, Sapopemba, Ipiranga, Cocada, Sara, Moleque, Pamonha e Sandy) do Gatil do Departamento de Clínica Médica da FMVZ por todas as alegrias no dia-a-dia, companheiros nas noites e noites em claro, sempre ronronando carinhosamente.

Meus sinceros agradecimentos!

“O papel dos infinitamente
pequenos na natureza é
infinitamente grande.”

Louis Pasteur

“- O senhor acha que estou
enlouquecendo?

- Eu acho que sim. Você está maluca,
pirada, perdeu um parafuso. Mas vou te
contar um segredo. As melhores pessoas
são assim.”

**Alice no País das Maravilhas – Lewis
Carroll**

“O tempo urge e a Sapucaí é grande.”

Giovanni Improtta

RESUMO

SANTOS, J. P. F. **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos.** [Effects of increasing levels of yeast cell wall on digestibility, fecal microbiota and gut fermentation products in diets for adult cats]. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos de teores crescentes de parede celular de levedura (PCL) seca em dietas para gatos adultos saudáveis sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes, composição da microbiota e concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, ácido láctico e aminas biogênicas nas fezes. Foram utilizados 14 gatos adultos saudáveis, machos e fêmeas, com peso médio de $4,40 \pm 1,05$ kg e idade média de $6,2 \pm 0,54$ anos, distribuídos em delineamento em blocos casualizados desbalanceados (períodos experimentais), com dois blocos e três ou quatro gatos por dieta em cada bloco, em quatro tratamentos experimentais: controle – 0% de PCL (T0); 0,2% de PCL (T20); 0,4% de PCL (T40) e 0,6% de PCL (T60), totalizando sete animais por dieta experimental. Os resultados foram avaliados pela função GLM do SAS através de regressões polinomiais simples. Verificou-se aumento linear no coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria mineral ($p=0,0305$) e tendência a comportamento quadrático para CDA da fibra bruta ($p=0,0792$). Com relação à microbiota fecal, houve aumento linear no número de log/copies de *Bifidobacterium spp.* ($p=0,0152$) e *Lactobacillus spp.* ($p=0,0299$), redução linear em *Clostridium perfringens* ($p=0,0371$) e quadrática no grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* ($p=0,0211$), já enterobactérias, bactérias ácido-láticas, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia felis* e *Salmonella spp.* não foi observado efeito ($p>0,05$). Para os produtos da fermentação observou-se aumento linear na concentração de ácido butírico ($p=0,0075$), acético ($p=0,0854$), valérico ($p=0,0465$), total de ácidos graxos de cadeia curta ($p=0,0612$) e ramificada ($p=0,0986$), putrescina ($p=0,0276$), cadaverina ($p=0,0036$), histamina ($p=0,0183$) e total de aminas biogênicas ($p=0,0024$) com a inclusão de PCL já ácido isobutírico ($p=0,0801$) apresentou aumento quadrático. Conclui-se que a PCL possui efeito prebiótico para gatos adultos saudáveis.

Palavras-chave: Felinos. Nutrição. Prebióticos. Saúde intestinal.

ABSTRACT

SANTOS, J. P. F. **Effects of increasing levels of yeast cell wall on digestibility, fecal microbiota and gut fermentation products in diets for adult cats.** [Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos]. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This study evaluated the effects of the inclusion of increasing levels of spray-dried yeast cell wall (YCW) in diets to healthy adult cats on the coefficient of apparent digestibility, microbiota composition and concentration of short and branched fatty acids, lactic acid and biogenic amines fecal. Fourteen adult cats were used, males and females, with an average weight of 4.40 ± 1.05 kg and average age of 6.2 ± 0.54 years old, distributed in a randomized unbalanced block design (experimental periods), with two blocks and three or four cats by diet each block into four treatments: control – 0% (T0), 0.2% of YCW (T20), 0.4% of YCW (T40) and 0.6% of YCW (T60), totaling seven animals per treatment. The results were evaluated by SAS GLM function by simple polynomial regression. It was verified a linear increase in coefficient of total tract apparent digestibility (CTTAD) of mineral matter ($p=0.0305$) and a tendency to quadratic behavior for CTTDA of crude fiber ($p=0.0792$). Regarding the fecal microbiota, a linear response of increase in log/copies of *Bifidobacterium spp.* ($p = 0.0152$) and *Lactobacillus spp.* ($p=0.0299$), linear reduction of *Clostridium perfringens* ($p=0.0371$) and quadratic in *E. coli*, *Hafnia alvei* and *Shigella spp. group* ($p=0.0211$), however enterobacteria, lactic acid bacteria, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* and *Chlamydia felis* effect was not observed ($p>0.05$). For fermentation products was observed linear increase in concentration of butyric acid ($p=0.0075$), acetic acid ($p=0.0854$), valeric ($p=0.0465$), total short chain fatty acids ($p=0.0612$) and branched ($p=0.0986$), putrescine ($p=0.0276$), cadaverine ($p=0.0036$), histamine ($p=0.0183$) and total biogenic amines ($p=0.0024$) with the inclusion of YCW however isobutyric acid ($p=0.0801$) showed a quadratic increase. Through this study was possible to address the prebiotic effect of YCW to adult healthy cats.

Keywords: Felines. Nutrition. Prebiotics. Intestinal health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Mecanismos de transferência da microbiota materna para os fetos e neonatos.....	22
Quadro 2 - Relação entre os principais microrganismos encontrados no tgi de seres humanos e os produtos finais da fermentação	29
Figura 1 - Vias para síntese de ácidos graxos de cadeia curta a partir da fermentação de carboidratos.....	30
Figura 2 - Vias para síntese de aminas biogênicas	32
Figura 3 - Produção de componentes de levedura submetida a processos de fermentação	37
Figura 4 - Animais alojados em gaiolas metabólicas e gatis de convivência.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação e composição química das dietas experimentais	44
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na detecção quantitativa de diferentes grupos bacterianos em amostras fecais de gatos	52
Tabela 3 - Consumo de matéria seca, produção fecal e urinária dos animais nos tratamentos experimentais	55
Tabela 4 - Médias do escore fecal dos animais e distribuição percentual do escore fecal dentro dos tratamentos experimentais	57
Tabela 5 - Consumo de PCL e de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente, energia digestível e metabolizável das dietas experimentais	59
Tabela 6 - Composição microbiana das fezes avaliadas através da técnica de cultivo em meio de cultura seletivo e PCR em tempo real dos animais nos tratamentos experimentais	62
Tabela 7 - Média do pH e concentração de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada nas fezes dos animais nos tratamentos experimentais	68
Tabela 8 - Concentração de aminas biogênicas nas fezes dos animais nos tratamentos experimentais	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	MICROBIOTA INTESTINAL DE FELINOS DOMÉSTICOS: PROCESSO DE COLONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO EM GATOS EM CRESCIMENTO E ADULTOS	20
2.1.1	Adesão e respiração bacteriana.....	20
2.1.2	Estabelecimento da microbiota.....	21
2.1.3	Caracterização da microbiota fecal de gatos adultos	24
2.2	PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	28
2.2.1	Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	28
2.2.2	Aminas biogênicas	32
2.3	MODULAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE GATOS: PREBIÓTICOS	34
2.3.1	A parede celular de levedura (PCL).....	37
2.3.2	Efeitos da PCL sobre parâmetros intestinais de cães e gatos	38
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	LOCAL DE CONDUÇÃO DO ENSAIO	42
4.2	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
4.3	DIETAS EXPERIMENTAIS E MANEJO DOS ANIMAIS	43
4.4	DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E ESCORE FECAL	46
4.5	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DE ENTEROBACTÉRIAS E BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS NAS FEZES ATRAVÉS DO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO EM MEIO DE CULTURA SELETIVO	47
4.6	DETERMINAÇÃO DO PH FECAL	48
4.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA, RAMIFICADA E ÁCIDO LÁTICO NAS FEZES	49
4.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS NAS FEZES	50

4.9	EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE DA MICROBIOTA FECAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL.....	51
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	PESO CORPORAL, CONSUMO DE MATÉRIA SECA, PRODUÇÃO FECAL E URINÁRIA, ESCORE DAS FEZES, CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES.....	54
5.2	MICROBIOTA FECAL.....	61
5.3	PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO NAS FEZES	67
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Embora a população de felinos domésticos no Brasil corresponda a pouco menos da metade dos cães domiciliados, há perspectivas de que os hábitos modernos da sociedade e as características de maior independência da espécie felina levem ao aumento no número dos gatos nos lares dos brasileiros, fenômeno similar ao ocorrido nos Estados Unidos e Europa (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013). Neste sentido, o mercado de alimentos destinados aos felinos também passa por mudanças, com intenso aquecimento, o que demanda novos estudos de matérias primas e aditivos, com o objetivo de longevidade associada à qualidade de vida para os animais, sendo estas as grandes preocupações dos proprietários e dos nutricionistas nos dias atuais.

O intestino possui ambiente ideal para a colonização e crescimento de microrganismos que ao colonizarem a mucosa intestinal desempenham função na digestão e absorção dos nutrientes, além de apresentar estreita relação com o sistema imune. Ao se modular a microbiota intestinal, pode-se favorecer maior número de microrganismos benéficos em detrimento ao número de potencialmente patogênicos, ferramenta importante para a maximização da saúde (FERNANDES et al., 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

De acordo com Lu e Walker (2001) a interação entre os microrganismos e o hospedeiro é complexa e envolve diversos mecanismos de ação. Neste sentido, os alimentos e seus componentes desempenham papel de grande importância neste processo. Com destaque para os prebióticos, os quais são definidos como ingredientes nutricionais não digeríveis, que produzem benefícios ao hospedeiro por estimularem de forma seletiva o crescimento e a atividade de um grupo ou mais de bactérias intestinais benéficas (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Dentre as substâncias com potencial prebiótico empregadas em alimentos para animais de companhia, destaca-se a parede celular da levedura seca (PCL) da *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, as pesquisas conduzidas para a avaliação deste aditivo concentram-se principalmente na espécie canina (STRICKLING et al., 2000; SWANSON et al., 2002; ZENK; MARQUAT; PIETRZAK, 2002; GRIESHOP et al., 2004; MIDDELBOS et al., 2007; MIDDELBOS; FASTINGER; FAHEY JR.,

2007; GOMES, 2009; FÉLIX et al., 2010; BELOSHAPKA et al., 2013) com escassez de dados em felinos (AQUINO et al., 2010; AQUINO et al., 2012; AQUINO et al., 2013), sendo requeridos estudos nos últimos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL DE FELINOS DOMÉSTICOS: PROCESSO DE COLONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO EM GATOS EM CRESCIMENTO E ADULTOS

2.1.1 Adesão e respiração bacteriana

A colonização bacteriana do intestino tem fundamental importância na saúde dos indivíduos (FERNANDES et al., 2000; LU; WALKER, 2001), neste sentido, a compreensão dos processos pelos quais as bactérias aderem na mucosa intestinal é importante para a eficiência de sua modulação. De acordo com Tortora, Funke e Case (2001), o processo de ligação de bactérias com os tecidos dos hospedeiros é conhecido como aderência e se dá por moléculas denominadas adesinas ou ligantes, com destaque para o glicocálix, fímbrias, proteínas de adesão e ácido lipoteicóico.

Dentre os processos relacionados à aderência e colonização bacteriana, Mandigan, Martikon e Parker (1997) relataram que há especificidade de tecidos, ou seja, as bactérias não aderem em todas as células igualmente, com seleção celular e topográfica. Além disso, há especificidade do hospedeiro, com aderência espécie-específica, sendo que cepas bacterianas que normalmente infectam seres humanos aderem fortemente ao seu epitélio, enquanto que em outras espécies animais tal aderência não é tão eficiente.

O processo de adesão e colonização trata-se de interação complexa entre os microrganismos e o hospedeiro (LU; WALKER, 2001), sendo verificado por Tuomola, Ouwehand e Salminen (1999) em extratos de glicoproteínas intestinais isoladas de seres humanos, por exemplo, que *Lactobacillus johnsonii* LJ1 e *L. casei* Shirota reduzem a aderência de *Salmonella typhimurium*, enquanto que *Lactobacillus* GG e *L. rhamnosus* elevam-na.

Além disso, a viabilidade, crescimento e multiplicação dos microrganismos apresentam relação direta com fatores ambientais, como a nutrição, temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio, sendo observada resposta bacteriana diferenciada de acordo com o ambiente, em decorrência de fatores filogenéticos (MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997). Dentre estas diferenças, o metabolismo respiratório trata-se de um fator classificatório das bactérias.

A respiração aeróbia ocorre na presença de oxigênio e este metabolismo é caracterizado pela utilização de oxigênio como aceptor de elétron e consequente produção de 38 ATPs a partir de uma molécula de glicose, com maior eficiência energética em comparação aos eucariotos, que produzem 36 ATPs. Já a respiração anaeróbia ocorre na ausência de oxigênio e o aceptor final de elétron não é o oxigênio, mas sim um substrato inorgânico, como exemplo: o NO_3 , SO_4 e CO_3 , na ausência do ciclo de Krebs ou a cadeia respiratória, tal processo é lento e repercute diretamente na multiplicação destas bactérias (MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2001). Permeando as bactérias aeróbias e anaeróbias estritas, têm-se as anaeróbias moderadas, microaerófilas, capnofílicas e aerotolerantes.

2.1.2 Estabelecimento da microbiota

O processo de colonização da microbiota intestinal de neonatos trata-se de um aspecto bastante importante para a saúde dos indivíduos ao longo da vida. De forma generalista, relata-se que o trato gastrointestinal (TGI) em cães e gatos apresenta padrão de colonização de microrganismos semelhante ao de outros mamíferos. De acordo com Buddington (2003), ao nascimento a mucosa intestinal de cães é estéril, mas é rapidamente colonizada por bactérias do canal do parto e do meio ambiente. Filhotes de um dia de vida já apresentam colonização por bactérias aerotolerantes e, posteriormente, elevação em anaeróbias.

Todavia, trabalhos recentes têm destacado a possibilidade de ocorrência da colonização bacteriana na fase fetal (THUM et al., 2012; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015). Nesse sentido, a hipótese de que a barreira placentária mantém os fetos estéreis ao longo de uma gestação saudável

continua sendo um dogma geral e, como resultado, a presença de qualquer bactéria no útero costuma ser considerada como um risco potencial para o feto (RODRÍGUEZ et al., 2015).

De modo geral, diferentes mecanismos podem explicar a interação na transferência da microbiota materna para a prole e envolvem questões relativas a fatores internos e externos, conforme apresentado no quadro 1.

Quadro 1 - Mecanismos de transferência da microbiota materna para os fetos e neonatos

Fatores	Mecanismos
Boca	A microbiota oral provavelmente seria transportada para o útero via corrente sanguínea.
Glândulas mamárias	Uma via enteromamária conduziria a microbiota através da circulação linfática e sanguínea. Além disso, a ingestão de leite e a presença de microrganismos contribuiriam para esse processo.
TGI	Microrganismos intestinais seriam conduzidos ao útero via penetração de células dendríticas enriquecidas com bactérias para o sistema linfático.
Canal do parto	O canal do parto representa uma importante via de colonização por microrganismos. Neste sentido tal microbiota parece sofrer alterações ao longo da gestação, o que repercutia em diferenças na microbiota do TGI de indivíduos nascidos através de parto normal ou cesariana.

Fonte: Adaptado de Thum et al. (2012); Funkhouser e Bordenstein (2013) e Rodríguez et al. (2015).

De acordo com Thum et al. (2012), uma microbiota materna rica em *Bifidobacterium spp.* com número reduzido de *E. coli* pode não só contribuir para o desenvolvimento fetal e neonatal, mas também reduzir a incidência de distúrbios imunológicos na infância. Os estudos para a avaliação da transferência direta da microbiota materna durante a gestação são complexos e envolvem questões éticas, sendo desconhecida a capacidade dos microrganismos de atravessarem a placenta de forma eficiente e persistirem no feto, bem como seus efeitos em longo prazo (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015), principalmente em gatos.

Ao avaliarem a microbiota fecal de gatos filhotes provenientes de fêmeas alimentadas com dietas seca ou úmida, Bermingham et al. (2013) observaram que a microbiota fecal das fêmeas gestantes foi alterada de acordo com a dieta, no entanto pequena alteração ocorreu na prole na fase pré-desmame, com diferença em relação aos microrganismos *Solobacterium*, *Peptococcaceae*, *Clostridium*, *Megamonas* e *Allisonela*. Já na fase pós-desmame, tais alterações foram pronunciadas, com modulação de filos associados à dieta, sendo verificado aumento em *Firmicutes* e *Actinobacteria* e redução em *Fusobacterium* nos animais que receberam dieta seca em comparação à dieta úmida.

No estudo amplo da sucessão, na microbiota fecal, ao longo dos meses pós-desmame em filhotes de gatos Jia et al. (2011) observaram que existe diferença na contagem total de bactérias fecais, *Bacteroidetes*, *Desulfovibrionales*, *Clostridium* cluster IX e bactérias lácticas, entre 4 semanas e 9 meses de vida.

Ao estudarem o efeito de dietas ricas em proteína e pobres em carboidrato (dieta A) e moderadas em proteína e carboidrato (dieta B) em filhotes de gatos com idade entre 8 e 16 semanas de vida, Deusch et al. (2014) puderam observar que a dieta produz importantes alterações na microbiota fecal dos animais, com redução no número de *Firmicutes* e *Actinobacteria*, mas aumento no número de *Fusobacteria* e *Proteobacteria* nos animais alimentados com a dieta A. Quando avaliados os gêneros bacterianos, os autores também verificaram mudanças relevantes, como aumento de *Megasphaera*, *Bifidobacterium*, *Acidaminococcus*, *Prevotella* e *Selenomonas* nos animais manejados com a dieta B, as quais apresentaram importante relação com a fermentação de carboidratos. Já com a dieta A, os autores relataram elevação em *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, destacando-se *Clostridium* e *Desulfovibrio* como microrganismos reconhecidamente fermentadores de substratos proteicos. No entanto, as diferenças ao longo do tempo foram de pouca relevância, o que os autores atribuíram à estabilização da microbiota na 8ª semana de vida dos gatos, sem importantes diferenças até a 16ª semana, em filhotes com acesso à dieta das mães. Assim, os autores sugerem que a evolução ao longo dos anos pode ter moldado os carnívoros e sua microbiota intestinal para facilitar a rápida transição da digestão do leite materno para o alimento sólido.

2.1.3 Caracterização da microbiota fecal de gatos adultos

De forma geral Suchodolski et al. (2011a) relataram que as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas ocorrem em grande abundância no intestino delgado, enquanto que as anaeróbias predominam no intestino grosso. Em revisão de literatura, Deng e Swanson (2015) mencionam que *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* são os filos bacterianos predominantes na microbiota fecal de cães e gatos, sendo que de forma geral a predominância das duas primeiras é similar aos seres humanos, com a diferença de que nos cães e gatos *Fusobacterium* parece também ter relativa importância percentual. Ressalta-se, no entanto, que as proporções das bactérias intestinais apresentam variações entre indivíduos, espécie, dieta, idade, ambiente e métodos analíticos, como coleta e manipulação da amostra, método de extração do DNA e RNA, *primers* e técnica empregada (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; KERR; BELOSHAPKA; SWANSON, 2014; DENG; SWANSON, 2015; GRZESKOWIAK et al., 2015).

As avaliações da microbiota fecal, seja para caracterização ou para avaliações nutricionais, tem recebido atenção nos últimos anos, o que foi acompanhado do desenvolvimento e aprimoramento de diversos métodos moleculares, conforme apresentado na revisão de Garcia-Mazcorro e Minamoto (2013). Cabe destacar que tais métodos apresentam relativa vantagem em relação à cultura bacteriana (plaqueamento), já que o último considera apenas bactérias viáveis, e atenção deve ser dada na diferenciação e contagem das colônias, bem como nas especificidades bacterianas, principalmente de bactérias fastidiosas, sendo possível que no plaqueamento bactérias comensais do TGI de cães e gatos não sejam efetivamente cultivadas, conforme observado por Willard et al. (2000).

Na caracterização específica da composição bacteriana de fezes de gatos adultos, no que tange aos filos bacterianos, Minamoto et al. (2012) mencionaram em revisão de literatura que as populações de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* perfazem mais de 99% da microbiota presente nas fezes de gatos; Barry et al. (2012) citam os filos *Firmicutes* (36,3% – 49,8%), *Bacteroidetes/Chlorobi* (36,1% – 24,1%), *Proteobacteria* (12,4% – 11,1%) como predominantes, seguidos de *Actinobacteria*; já Bell et al. (2014) relataram que *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e

Actinobacteria compõe mais de 98% da microbiota fecal de felinos. Tun et al. (2012), por sua vez, descreveram que os principais filos bacterianos presentes nas fezes de gatos foram *Bacteroidetes/Chlorobi* (67,5%), *Firmicutes* (13%), *Proteobacteria* (5,9%), *Actinobacteria* (1,2%), *Fusobacteria* (0,7%), bem como presença de *Chlamydiae/Verrucomicrobia* (0,3%), contudo ao avaliar separadamente *Bacteroidetes* e *Chlorobi*, as percentagens situaram-se em 9% e 0,02%, respectivamente, o que não deixou claro qual grupo representou a diferença e, segundo Garcia-Mazcorro e Minamoto (2013) estas diferenças podem ser atribuídas à análise de bioinformática.

Com relação à avaliação conjunta de filos e gêneros bacterianos, Desai et al. (2009) observaram grande variação individual. Os filos *Actinobacteria* (particularmente *Bifidobacterium spp.*) e *Firmicutes* (*Clostridium spp.* e *Lactobacillus spp.*) foram as que apresentaram maior prevalência no TGI dos felinos, enquanto a população de *Proteobacteria* foi a que apresentou o menor número de clones. De forma semelhante Handl et al. (2011) relataram elevada porcentagem do filo *Firmicutes* (92,1%), seguido de *Actinobacteria* (7,3%). Dentro do filo *Firmicutes*, a classe *Clostridia* foi a predominante (65,1%), com destaque para os grupos *Clostridium* (clusters XIVa e XI) e *Ruminococcus*, além disso as classes *Erysipelotrichi* (13,3%) e *Bacilli* (9,4%) foram relevantes, a última constituída quase que exclusivamente pela ordem *Lactobacillales*, principalmente os gêneros *Enterococcus spp.* e *Lactobacillus spp.*

Ritchie et al. (2010) observaram maior predominância do filo *Firmicutes* (87,3%), seguido de *Proteobacteria* (7,9%), *Bacteroidetes* (2,4%), *Actinobacteria* (2,3%) e *Fusobacteria* (0,2%), nas fezes de gatos. No filo *Firmicutes* foram predominantes *Clostridium* cluster XI, seguido de I, XIVa e IV, destacando-se estes membros como importantes produtores de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Em relação às bactérias potencialmente benéficas, *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, os autores observaram que somente 13,3% apresentaram os gêneros nas fezes quando avaliadas através de *primer* universal, no entanto com *primers* específicos, foi verificado que 92% dos animais apresentavam *Lactobacillus spp.* e 100% *Bifidobacterium spp.*, sendo observada elevada variabilidade de espécies entre os indivíduos. De forma semelhante Beloshapka et al. (2013) não verificaram a presença de *Bifidobacterium spp.* e observaram baixíssima porcentagem de *Lactobacillus spp.* nas fezes de cães através da avaliação com

primers universais, apenas quando foram avaliadas com os especificamente desenhado para a bactéria alvo. Desta forma, tais achados podem estar relacionados à possível baixa abundância destes gêneros bacterianos nas fezes dos animais (RITCHIE et al., 2010).

Evidencia-se ainda que existe relativa variabilidade nos resultados da caracterização da microbiota fecal de felinos, portanto são necessários mais estudos com técnicas e modelos experimentais padronizados. Tais avaliações são importantes, pois a proposta fundamental dos estudos da microbiota fecal de cães e gatos se concentra em entender a taxonomia, dinâmica e funções das comunidades bacterianas e seu inter-relacionamento, bem como compreender as substâncias produzidas e consumidas pelos microrganismos, a influência de fatores ambientais, a interação com o hospedeiro, e a diferença entre indivíduos saudáveis e doentes (DENG; SWANSON, 2015). Neste sentido, recentes estudos têm realizado análises de metabolômica nas fezes de cães e gatos, com o objetivo de compreender a atividade metabólica da microbiota através de avaliações que consideram a caracterização de todos os genes do hospedeiro e da microbiota (SUCHODOLSKI, 2011b).

Em avaliação metabolômica da microbiota fecal de gatos, Barry et al. (2012) relataram que as principais categorias funcionais presentes foram: metabolismo de carboidratos, proteínas, aminoácidos e DNA, componentes da parede celular e cápsula, vitaminas e pigmentos e fatores de virulência, o que corrobora Tun et al. (2012) com gatos e Swanson et al. (2011) com cães, os últimos destacando que seus achados com cães para as categorias funcionais foram semelhantes às observadas em seres humanos.

Diversos gêneros bacterianos potencialmente patogênicos parecem estar presentes na microbiota fecal de gatos, conforme observado por Handl et al. (2011) que relataram a presença de *Clostridium perfringens*, *Enterococcus spp.*, *E. coli* e *Helicobacter spp.*; Tun et al. (2012) a presença de espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter* e *Helicobacter*. Em revisão de literatura, realizada por Minamoto et al. (2012) é apontado que felinos parecem apresentar na microbiota intestinal diversos gêneros e espécies relacionadas à enteropatias em seres humanos, como *Salmonella spp.*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp.*, *E coli* e *Helicobacter spp.*. No entanto, os autores destacam

que a interpretação deve ser criteriosa, já que a presença destes microrganismos não parece ter íntima relação com alterações do TGI, como diarreia, por exemplo, fato dependente principalmente da virulência das cepas, bem como da taxa de prevalência destes microrganismos no TGI, *status* imunológico dos animais e equilíbrio da microbiota.

De forma bastante generalista, em estudos com nutrição, as principais bactérias intestinais potencialmente patogênicas avaliadas são *E. coli*, *Salmonella spp.* e *Clostridium perfringens*.

As *E. coli* são bactérias que pertencem ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria* e família *Enterobacteriaceae*, que são classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) associada a diarreia não pela produção de toxina, mas por causarem lesões histopatológicas; *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) que não invadem o epitélio intestinal, mas produzem toxinas termoestáveis e termolábeis; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) com invasão epitelial, multiplicação intracelular e consequente invasão das células epiteliais adjacentes; *E. coli* enteroagregativas (EAEC) com aderência inicial à mucosa, produção de muco e citocinas; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) associadas a lesão de adesão, além de hemorragia e edema da lâmina própria pela liberação de citocinas (NATARO; KAPPER, 1998).

A *Salmonella spp.* também pertence a família *Enterobacteriaceae*, e trata-se de uma bactéria patogênica associada à alterações no TGI, como: diarreia, descamação de enterócito, alteração de transportadores de mucosa intestinal e anorexia (APANAVICIUS et al., 2007; KERR; DOWD; SWANSON, 2014). Em cães Kerr, Dowd e Swanson (2014) observaram que a patogenia esteve relacionada diretamente com *E. coli/Shigella spp.* e *Clostridium perfringens*. Ainda em relação ao filo *Proteobacteria*, dentre outras bactérias potencialmente patogênicas se destaca também a *Campylobacter spp.*, pertencente à classe *Epsilon Proteobacteria* e a família *Campylobacteraceae*, a qual está diretamente associada a perturbações do TGI (TORTORA; FUNKE; CASE, 2001; MAUKONEN, 2012).

O *Clostridium perfringens* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Clostridia* e família *Clostridiaceae* e está relacionado a diversas alterações gastrintestinais e a gangrena gasosa em seres humanos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2001). De forma geral o *C. perfringens* é classificado em cinco sorotipos (A, B, C, D e E) produtores principalmente das toxinas alfa, beta, epsilon e iota, bem como das toxinas de importância secundária, teta, delta, lambda e enterotoxina (CAVALCANTI et al.,

2004). Em cães e gatos, os resultados do *C. perfringens* sobre a possível produção de diarreia ainda permanecem incertos (SILVA; LOBATO, 2015), assim como os demais gêneros bacterianos, conforme citado por Minamoto et al. (2012), sendo que as avaliações de tais gêneros bacterianos são importantes tanto para avaliação de infecções endógenas, exógenas e superinfecções, bem como o papel da nutrição em sua modulação.

Outro microrganismo potencialmente patogênico descrito em felinos é a *Chlamydia*, pertencente ao filo *Chlamydiae* e família *Chlamydiaceae*, caracterizado como uma bactéria intracelular (LONGBOTTOM; CULTER, 2003) associada à conjuntivite, febre, letargia, claudicação e redução de peso corporal (TERWEE et al., 1998). Apesar dos estudos concentrarem-se na conjuntivite em felinos, é citado que a bactéria pode colonizar a mucosa gástrica da espécie, conforme Hargis, Prieur e Gaillard (1983) e Gaillard et al. (1984), os últimos com registros de sinais e lesões de conjuntivite, rinite e gastrite após a inoculação aerossol oral do microrganismo.

Em aves, a avaliação da presença de *Chlamydia psittacci* através de *swabs* da cloaca e culturas bacteriológicas trata-se de prática comum, pois a transmissão da mesma pode ocorrer por contaminação fecal (SMITH et al., 2011).

Desta forma pode-se verificar que a avaliação da microbiota fecal de animais trata-se de uma temática bastante importante, no entanto em estudos com enfoque nutricional a complementação da relação dos microrganismos com os produtos da fermentação é bastante importante para a melhor compreensão da funcionalidade de determinado ingrediente.

2.2 PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

2.2.1 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC de principal importância nutricional, acético, propiônico e butírico, são produzidos no intestino de animais monogástricos. Em diversas espécies animais os AGCC contribuem com o requerimento energético basal, no entanto nos felinos tal contribuição é mínima, com isso a sua função está relacionada principalmente à nutrição das células intestinais (BROSEY; HILL; SCOTT, 2000).

A síntese dos ácidos orgânicos e outras moléculas orgânicas, produtos finais da fermentação, ocorrem em anaerobiose, que apresenta como características não requerer oxigênio, ciclo de Krebs ou cadeia de transporte de elétrons, utilizarem uma molécula orgânica como aceptor final de elétron e produzirem pequena quantidade de ATP (somente uma ou duas moléculas de ATP por molécula de material, o qual é gerado durante a glicólise), pois grande parte da energia permanece no produto final orgânico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2001).

De acordo com Tortora, Funke e Case (2001), vários microrganismos podem fermentar diversos substratos e os produtos finais da fermentação dependem dos microrganismos em particular, enzimas presentes e ativas, bem como do substrato. No Quadro 2 são apresentados os principais produtos gerados por alguns microrganismos presentes no TGI de seres humanos a partir da fermentação de hexoses.

Quadro 2 - Relação entre os principais microrganismos encontrados no tgi de seres humanos e os produtos finais da fermentação

Grupo bacteriano	Principais produtos da fermentação das hexoses
<i>Roseburia/Eubacterium rectale (grupo)</i>	Butirato, formato e lactato
<i>Eubacterium hallii</i>	Butirato, formato e lactato
<i>Ruminococcus obeum</i>	Acetato
<i>Lachnospira spp.</i>	Formato, acetato, lactato e succinato
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Butirato, formato e lactato
<i>Ruminococcus bromii, R. flavefaciens</i>	Acetato, formato, lactato e succinato
<i>Eubacterium cylindroides</i>	Butirato, acetato, lactato, succinato e formato
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Lactato, formato e acetato
<i>Atopobium spp.</i>	Acetato, formato e lactato
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	Acetato, proprionato e succinato
<i>Proteobacteria</i>	Lactato, acetato, succinato e formato

Fonte: Adaptado de Louis et al. (2007)

O processo de formação dos AGCC envolve diversas vias metabólicas. De forma resumida, a síntese de ácido acético ocorre através da hidrólise do acetil-CoA, formado a partir do piruvato, nesta reação há formação de CO₂, o qual é convertido com grupo metil e CoA à acetil-CoA. Ressalta-se que a maior parte do piruvato é convertido à acetil-CoA. Para a síntese de ácido propiônico, três vias metabólicas podem estar envolvidas, sendo elas: via do succinato, via da fucose e via do acrilato pela rota do lactato. Já para o ácido butírico, ocorre a reação inversa de beta-

oxidação, bem como duas rotas alternativas, a primeira pela ação da fosfotransbutirilase e butirato-quinase, e a segunda que emprega uma via de CoA-transferase, que transfere a fração CoA do butiril-CoA para o acetato. Em relação à última via, salienta-se que o acetato estimula a rota da CoA-transferase, para detoxificação de seu excesso, sendo que bactérias adaptadas para sobreviver em ambientes diferentes do lúmen intestinal possuem rota da butirato-quinase, a qual não depende de altas concentrações de acetato, o que pode permitir que estas bactérias sobrevivam a ampla gama de condições ambientais (LOUIS et al., 2007; DEN BESTEN et al., 2013). Na Figura 1 são apresentadas de forma sucinta as rotas metabólicas descritas para formação dos principais AGCC.

Figura 1 - Vias para síntese de ácidos graxos de cadeia curta a partir da fermentação de carboidratos

Fonte: Louis et al. (2007)

Via de fermentação ao butirato (1) e propionato (2-4). 1a: via butirato-quinase; 1b: via butiril-CoA, via CoA-transferase; 2: via acrilato; 3: via succinato; 4: via fucose; PEP: fosfoenolpiruvato.

Além dos AGCC, o ácido láctico trata-se de uma importante substância do metabolismo bacteriano, com capacidade de redução do pH e consequente redução de bactérias potencialmente patogênicas (CARBONERA; ESPIRITO SANTO, 2010), bem como na síntese de AGCC (DUNCAN; LOUIS; FLINT, 2004; BOURRIAUD et al., 2005).

Durante a glicólise, primeira etapa de produção do ácido láctico, a molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato, o que gera a produção de duas moléculas de ATP. Na próxima etapa, as duas moléculas de piruvato são reduzidas a duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de ácido láctico, sendo o ácido láctico o produto final desta reação. De forma geral, as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus* são consideradas importantes produtoras de ácido láctico, conhecidas como homofermentativas e o único produto final de seu metabolismo sacarolítico é o ácido láctico (>85%) (TOTORA; FUNK; CASE, 2001). Especificamente em relação aos *Lactobacillus*, a produção de ácido láctico é espécie-específica, já que podem ser classificadas também como: homofermentativas obrigatórias, sendo as principais representantes *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. salivarius*; heterofermentativas facultativas, onde as hexoses são quase que exclusivamente oxidadas a ácido láctico, mas em condições de limitação de glicose são gerados além de ácido láctico, ácido acético, etanol e ácido formico, dentre as quais se destacam *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*; e heterofermentativas obrigatórias, nas quais as hexoses são fermentadas a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, com destaque para *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. oris* e *L. reuteri* (MAUKONEN, 2012).

Outro gênero com potencial benéfico é o das *Bifidobacteria*, as quais possuem ácido acético, formico e láctico como produtos finais de seu metabolismo sacarolítico, com capacidade de hidrólise de uma grande variedade de polissacarídeos (LOUIS et al., 2007). É descrito que apesar do *Bifidobacterium spp.* não possuir capacidade de produção de butirato, apresenta metabolismo cruzado com bactérias butíricas, elevando a concentração deste AGCC em consorciação com tais bactérias (DUNCAN; LOUIS; FLINT, 2004; BELENGUER et al., 2006).

Além dos AGCC, oriundos do metabolismo sacarolítico, outros produtos são formados no processo de fermentação de compostos nitrogenados, como amônia, aminas biogênicas e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) como ácido valérico, isovalérico e isobutírico. Neste sentido, tem sido discutido que aminoácidos

podem ser utilizados para a síntese de células bacterianas ou catabolizados em diferentes vias que podem ter efeitos positivos ou negativos no hospedeiro (NEIS; DEJONG; RENSEN, 2015).

2.2.2 Aminas biogênicas

As aminas são moléculas orgânicas de baixo peso molecular que possuem atividade metabólica e são formadas naturalmente de forma endógena. A classificação das aminas biogênicas é realizada quando estas são sintetizadas por ação de um organismo vivo, através da descarboxilação de aminoácidos, sendo que em alimentos sua produção está relacionada principalmente ao tempo e modo de armazenamento (HALÁSZ et al., 1994; SHALABY, 1996). De forma geral, as principais aminas biogênicas de importância são: feniletilamina, tiramina, triptamina, histamina, putrescina, espermina, espermidina, agmatina e cadaverina, sendo os precursores apresentados na Figura 2, assim como a relação cruzada para síntese, como no caso da putrescina que origina espermina e espermidina e pode ser ressintetizada por ambas.

Figura 2 - Vias para síntese de aminas biogênicas

Fonte: Adaptado de Halász et al. (1994)

Os retângulos em destaque (vermelho) referem-se às aminas correspondentes.

Além da classificação em natural e biogênica, as aminas podem ser classificadas de acordo com a função que exercem, estrutura química, bem como com o número de grupamento amina, dentre as quais se destacam as poliaminas (espermidina, putrescina e espermina) que possuem importante papel na síntese de DNA, RNA e proteínas, o que repercutiria no crescimento e renovação celular (BARDÓCZ, 1995).

Dentre os fatores que influenciam a formação das aminas biogênicas em alimentos estão a disponibilidade de aminoácidos livres, sinergismo entre as aminas, armazenamento dos alimentos e a presença de microrganismos, como *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, entre outros (BARDÓCZ, 1995; SHALABY, 1996; BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999). No entanto, as carboxilases presentes nos microrganismos não são muito específicas e sua atividade é característica para as espécies e cepas bacterianas (BARDÓCZ, 1995).

Na tentativa de se elucidar o papel dos microrganismos sobre a produção de aminas biogênicas, diversos trabalhos foram conduzidos principalmente na área de alimentos, dentre os quais se pode citar Bover-Cid e Holzapfel (1999) que observaram que espécies específicas de bactérias ácido lácticas, principalmente *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Carnobacterium* foram responsáveis por considerável formação de tiramina. As *Enterobacteriaceae* (dentre elas *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* e *Klebsiella*) estiveram associadas à formação de cadaverina e putrescina, de forma semelhante Bover-Cid et al. (2001) relacionaram espécies de *Lactobacillus* à tiramina, triptamina, feniletilamina, cadaverina e putrescina; *Enterococcus* à tiramina e feniletilamina, e *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*) à cadaverina e putrescina.

De forma geral, as aminas são consideradas substâncias tóxicas que podem causar diversas alterações clínicas nos indivíduos, dependendo de seu teor nos alimentos, dentre os quais: histamina, por exemplo, atua na liberação de adrenalina e noradrenalina e consequente excitação da musculatura lisa do útero, intestino e trato respiratório; tiramina promove estímulo neurológico, controle da secreção gástrica, alterações cardiorrespiratórias, elevação da glicemia, liberação de noradrenalina e enxaqueca; putrescina e cadaverina causam hipotensão, braquicardia, paresia de extremidades e potencializam a toxicidade de outras aminas; feniletilamina estimula a liberação de noradrenalina, promove aumento da

pressão sanguínea e enxaqueca; triptamina, por sua vez, eleva a pressão sanguínea (SHALABY, 1996). É importante destacar que os efeitos das aminas biogênicas de origem fecal no hospedeiro são desconhecidos. Dessa forma, sua quantificação é utilizada até o momento principalmente como marcador do metabolismo microbiano proteolítico.

2.3 MODULAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE GATOS: PREBIÓTICOS

Os aditivos alimentares são definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Instrução Normativa nº13 de 30 de abril de 2004, como substâncias, microrganismos ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que normalmente não é utilizado como ingrediente, que tenha ou não valor nutritivo, e que afete ou melhore as características do alimento ou dos produtos animais (BRASIL, 2004), dentre os quais pode-se citar os prebióticos.

Os prebióticos são definidos como compostos não digeridos pelo organismo animal, mas que são seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal, estimulando o crescimento e/ou a atividade de alguns destes microrganismos capazes de prover benefícios ao hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Dentre as características para as substâncias serem classificadas como prebióticas, Crittenden e Playne (2009) citam: incapacidade de digestibilidade pelo hospedeiro (ou parcialmente digerido), não absorvível no intestino delgado, fracamente fermentável pelas bactérias da microbiota oral e por bactérias patogênicas do TGI e possibilidade de fermentação pelos microrganismos benéficos.

De forma geral, O'Toole e Cooney (2008) relataram que as cepas de bactérias benéficas agiram sobre a microbiota patogênica pela competição por nutrientes; produção de produtos da fermentação com efeito inibitório; produção de vitaminas e substratos de crescimento para outras bactérias benéficas; produção de bacteriocinas e enzimas; competição pelos sítios de ligação; redução da inflamação; e estímulo ao sistema imune inato. Lu e Walker (2001) relatam ainda que as bactérias benéficas induzem a transdução de sinal, que fortalece as junções intercelulares e desse modo, reduz o transporte paracelular de antígenos que

causam inflamação. São relatadas vantagens da inclusão dietética dos prebióticos em relação aos probióticos (microrganismos vivos), já que os primeiros apresentam estabilidade em longos períodos de *shelf life*, em diferentes faixas de pH e temperaturas; propostas físico-químicas em alimentos, com alteração de textura e sabor; resistência à acidez, proteases e bile durante a passagem pelo TGI; estímulo à atividade fermentativa da microbiota comensal, e assim evita a incompatibilidade hospedeiro/cepa e a necessidade de competir com uma microbiota já estabelecida (CRITTENDEN; PLAYNE, 2009).

Ao avaliar os efeitos de Frutoligossacarídeos (FOS; 0,5%) e Galactoligossacarídeos (GOS; 0,5%) sobre a microbiota fecal de gatos, Kanakupt et al. (2011) puderam observar que os aditivos induziram a aumento em *Bifidobacterium spp.* nas fezes, em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, Barry et al. (2010), ao estudarem alta dose de FOS (4%) pectina (4%) e celulose (4%), citaram modulação da população bacteriana intestinal, com aumento de *Bifidobacterium spp.* e redução de *E. coli*. nos animais que receberam FOS em comparação aos tratamentos celulose e pectina. Esses dados vão ao encontro à pesquisa de Sparkers et al. (1998) que, ao utilizarem doses reduzidas de FOS (0,75%) para gatos, observaram aumento de 164 vezes no número de *Lactobacillus spp.* redução de 75% no número de *E. coli* e 98% em *Clostridium perfringens*, em comparação ao período sem suplementação.

Com relação ainda às altas doses de FOS empregadas por Barry et al. (2010), em estudo de metabolômica foi observada elevação em genes relacionados ao metabolismo de manose nos indivíduos que receberam FOS em comparação aos que receberam celulose. Os autores relataram que a levedura que estava presente em todas as dietas (3%) pode ter repercutido em efeito sinérgico com a microbiota associado ao tratamento com FOS (BARRY et al., 2012).

Em relação aos produtos da fermentação nas fezes, em estudo *in vitro* com inoculo fecal oriundo de felinos suplementados com FOS, Barry et al. (2011) observaram aumento na produção de AGCC. Ao estudarem os efeitos do FOS sobre os produtos da fermentação em gatos, Kanakupt et al. (2011) observaram que a concentração total de AGCC e AGCR, assim como a concentração de ácido butírico, aumentaram com a suplementação associada de FOS (0,5%) + GOS (0,5%), o que esteve associado à redução do pH das fezes. Ao avaliarem a inclusão de 4% de FOS, pectina e celulose, Barry et al. (2010) observaram aumento na concentração

fecal de ácido acético, propiônico e total de AGCC nos animais suplementados com pectina, e aumento na concentração fecal de ácido butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, total de AGCR em gatos que receberam FOS e pectina, bem como em determinadas aminos biogênicas, em comparação à celulose.

O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes é uma importante variável a ser determinada para alimentos suplementados com prebióticos, pois se trata de um parâmetro básico a ser atendido pela nutrição. Neste sentido, Kanakupt et al. (2011) observaram redução na digestibilidade aparente da proteína bruta em gatos que receberam FOS + GOS. Os mesmos autores atribuem tal achado ao aumento da biomassa microbiana fecal, o que afetaria diretamente o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta, explicação semelhante à publicada por Hesta et al. (2001) e Middelbos et al. (2007), que também constataram declínio na digestibilidade aparente da proteína bruta em gatos e cães suplementados com prebiótico, respectivamente.

Além da proteína bruta, Barry et al. (2010) também observaram diminuição na digestibilidade aparente do extrato etéreo ácido em gatos suplementados com pectina (4%), o que, de acordo com os autores, pode ser explicado pelo aumento na viscosidade do quimo intestinal ocasionado pela pectina, com redução na absorção de ácidos graxos.

Ao estudar a inclusão de 3,11% de FOS em dietas para gatos, Hesta et al. (2005) observaram tendência a aumento na produção fecal e na excreção de nitrogênio nas fezes, mas redução no nitrogênio urinário, da mesma forma, Verbrugghe et al. (2010) também encontraram redução na excreção do nitrogênio urinário de gatos que receberam dieta com 4% de inulina e oligofrutose. Em cães suplementados com probióticos, Feliciano et al. (2009) observaram aumento na metabolização da energia, sem diferença no energia digestível, o que os autores atribuem a uma possível melhora da utilização dos aminoácidos, os quais seriam substituídos por ácido butírico na nutrição das células intestinais e disponibilizados para outras funções do organismo, contudo os autores não avaliaram a excreção de nitrogênio fecal e urinário dos animais com a suplementação probiótica.

Além do FOS e GOS, outras fontes prebióticas vêm sendo estudadas e utilizadas em animais de companhia dentre elas a parede celular de levedura (PCL).

2.3.1 A parede celular de levedura (PCL)

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são eucariotos unicelulares que são utilizadas em diversos processos industriais, como na panificação, indústria sucroalcooleira e na produção de bebidas. Neste sentido houve a necessidade de agregar valor e utilizar os excedentes da biomassa microbiana, sendo os principais produtos: levedura inativa íntegra ou autolisada, extrato de levedura, PCL e mais recentemente as mananoproteínas purificadas, conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Produção de componentes de levedura submetida a processos de fermentação

Fonte: Adaptado de Sgarbieri et al. (1999)

Retângulos em destaque (vermelho) referem-se aos componentes.

No entanto, atualmente as leveduras e seus componentes não têm sido considerados subprodutos, já que para o abastecimento de mercados cada vez mais exigentes, plantas industriais têm sido projetadas exclusivamente para sua produção e beneficiamento, com a proposta de inclusão em alimentos para seres humanos e animais.

A PCL trata-se de um potencial ingrediente prebiótico largamente utilizado em dietas para animais de produção e companhia, o que está relacionada à sua composição química, formada por quitina, 1,3 e 1,6 beta-glucanos e mananoproteínas (OSUMI, 1998), cuja digestão não é conseguida pelos mamíferos e apenas podem ser utilizados por determinados grupos bacterianos em detrimento de outros.

O rendimento da PCL é dependente do processo, mas de forma geral Kollár et al. (1997) relataram que a PCL corresponde entre 15-30% do peso da célula em base da matéria seca, já Sgarbieri et al. (1999) obtiveram entre 40-45% de rendimento no processo experimental de obtenção da PCL a partir de biomassa microbiana oriunda da indústria cervejeira, além disso a composição da PCL é relativamente variável, conforme citação de Fleet (1991) que relataram que a PCL pode possuir entre 30 a 60% de glucanos, 25 a 50% de mananos, 13 a 15% de proteína, 2 a 14% de lipídio e 1 a 2% de quitina.

É importante ressaltar ainda, que em muitos trabalhos é relatado o uso de MOS como fonte prebiótica, no entanto os autores trabalharam de fato com a PCL e não frações purificadas de mananoproteínas.

2.3.2 Efeitos da PCL sobre parâmetros intestinais de cães e gatos

Os trabalhos que avaliaram a inclusão da PCL em alimentos destinados à animais de companhia concentram-se principalmente em cães. Middelbos et al. (2007) avaliaram níveis crescentes (0%; 0,05%; 0,25%; 0,45% e 0,65%) de PCL em dietas de cães e seus efeitos sobre a microbiota intestinal e digestibilidade dos nutrientes, sendo a população de microrganismos avaliada através de técnica molecular e por plaqueamento. Na técnica molecular, a contagem de *Lactobacillus spp.* apresentou tendência ao comportamento cúbico, com número mais elevado no

tratamento 0,45% e *E. coli* reduzida com 0,25%. Já com o emprego da técnica por plaqueamento, *E. coli* apresentou significativa redução linear, possivelmente pela afinidade do MOS à bactéria, o que levou à ligação ao aditivo, com posterior eliminação fecal e redução da carga microbiana. Beloshapka et al. (2013) por sua vez, verificaram que cães suplementados com PCL (1,4%) apresentaram elevação de *Bifidobacterium spp.*, no entanto não foi efetiva na redução de *E. coli* em relação ao grupo controle, o que foi observado com a inclusão de inulina.

Ao avaliarem a produção de AGCC em cães suplementados com PCL, Zentek, Marquat e Pietrzak (2002) encontraram redução do pH fecal e aumento da produção de AGCC em comparação ao controle. Gomes (2009) encontrou aumento linear na concentração de ácido butírico e redução de algumas aminas biogênicas, em cães suplementados com PCL.

Com relação ao efeito da PCL na digestibilidade de nutrientes da dieta, Middelbos et al. (2007) encontraram efeito cúbico, com menor digestibilidade na inclusão de 0,25% do aditivo, e maior aproveitamento no tratamento com 0,45% de PCL. Zentek, Marquat e Pietrzak (2002) ao suplementarem cães com 1g/kg de peso corporal (5,88%) de PCL, encontraram diminuição na digestibilidade dos extrativos não-nitrogenados, matéria seca e proteína bruta, corroborando os resultados de Swanson et al. (2002) na suplementação de 0,5% (2g/dia) de PCL para cães, com tendência à redução na digestibilidade da matéria seca e orgânica. Um estudo nacional demonstrou tendência semelhante na digestibilidade aparente da proteína bruta e matéria seca ao empregar mananoproteína purificada em dieta para cães (CHIZZOTTI, 2012).

De acordo com Swanson et al. (2002) a possível explicação para a redução na digestibilidade da proteína bruta está relacionada à aglutinação do MOS à proteína da dieta. Outros autores relatam que o aumento na produção de bactérias ácido-láticas pode refletir em redução na digestibilidade aparente da proteína bruta (MIDDELBOS et al., 2007).

Estudos conduzidos com a inclusão de PCL para felinos são escassos, sendo localizado na literatura apenas o trabalho de Aquino (2009), o qual originou os artigos publicados em anos subsequentes (AQUINO et al., 2010; AQUINO et al., 2012; AQUINO et al., 2013). Nestes trabalhos os autores relatam aumento linear na digestibilidade da matéria seca, com inclusão do aditivo, sem diferença na produção de AGCC e microbiota fecal, entretanto cabe ressaltar que a inclusão da PCL foi

realizada em alimentos secos após o processo de extrusão, em mistura do alimento com água, alterando assim as características da dieta. Além disso, neste mesmo estudo a avaliação dos produtos da fermentação não incluiu as análises de AGCR e aminas biogênicas, apenas produtos oriundos do metabolismo de carboidratos, informações inexistentes na literatura até o momento, para a espécie felina.

É importante destacar ainda que em importante parcela dos estudos com PCL para cães (STRICKLING et al., 2000; SWANSON et al., 2002; GRIESHOP et al., 2004) e para gatos (AQUINO et al., 2012; AQUINO et al., 2013) a microbiota fecal foi analisada pela técnica de plaqueamento em meio de cultura seletivo. Com isso, fazem-se necessárias mais pesquisas que avaliem os efeitos da PCL, principalmente em gatos, com técnicas moleculares para determinação da microbiota fecal, já que várias avaliações separadas de diferentes pesquisadores são requeridas para definir o efeito prebiótico de um determinado composto (GIBSON et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Estudar os efeitos de teores crescentes de parede celular de levedura (PCL) seca em alimento para gatos adultos sobre o coeficiente de digestibilidade dos nutrientes, composição microbiana (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.*, *Chlamydia felis*, *Campylobacter spp.* e grupo *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.*) e concentração dos produtos da fermentação nas fezes (ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos de cadeia ramificada e aminas biogênicas).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DO ENSAIO

O presente estudo foi conduzido entre os meses de junho a outubro de 2012 no gatil Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado na cidade universitária “Armando de Salles Oliveira”, município de São Paulo, Brasil, com aprovação pela “Comissão de Ética no Uso de Animais” da FMVZ/USP (protocolo nº 2734/2012).

4.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 14 gatos adultos saudáveis, avaliados através de exame físico e hemograma, machos ou fêmeas, com peso corporal médio de $4,40 \pm 1,05$, idade média de $6,2 \pm 0,54$ anos e escore de condição corporal médio $5,0 \pm 0,27$.

Os animais foram distribuídos em delineamento em blocos casualizados desbalanceados (sendo considerados como fator do bloco os períodos experimentais), com dois blocos e três ou quatro gatos por dieta em cada bloco, em quatro tratamentos experimentais: controle – 0% de PCL (T0); 0,2% de PCL (T20); 0,4% de PCL (T40) e 0,6% de PCL (T60). Foi considerado um animal por parcela experimental, totalizando sete parcelas experimentais por tratamento.

Cada período experimental teve duração de trinta e quatro dias, sendo dividido nas seguintes fases: adaptação às dietas experimentais (1º ao 21º dia); coleta de fezes, urina e sobras de alimentos para digestibilidade e avaliação do escore das fezes (22º ao 29º dia); coleta de fezes para enumeração de bactérias e determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, ácido láctico, pH e aminas biogênicas nas fezes (30º ao 34º dia). Foi utilizado intervalo de trinta dias entre os períodos experimentais, com o objetivo de eliminar efeitos residuais dos tratamentos anteriores sobre o próximo período.

Os animais foram pesados no início e no final de cada período experimental, com o objetivo de monitoramento do peso corporal ao longo do estudo.

4.3 DIETAS EXPERIMENTAIS E MANEJO DOS ANIMAIS

As dietas experimentais foram produzidas na fábrica de ração da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Jaboticabal, Brasil).

Foi formulada uma dieta controle, de modo a atender as recomendações da Association of American Feed Control Officials (2009) para felinos em manutenção, e a partir da mesma as inclusões de PCL seca (Bio-MOS[®], Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda., Curitiba, Brasil) foram desdobradas em substituição ao amido de milho. Na Tabela 1 são apresentadas as formulações e a composição química analisada das dietas experimentais.

Tabela 1 - Formulação e composição química das dietas experimentais

Ingredientes (%)	T0	T20	T40	T60
Amido de milho	1,0	0,80	0,60	0,40
Parede celular de levedura	-	0,20	0,40	0,60
Milho grão	45,35	45,35	45,35	45,35
Farinha de vísceras de frango	30,08	30,08	30,08	30,08
Glúten de milho 60	9,39	9,39	9,39	9,39
Gordura de aves	9,21	9,21	9,21	9,21
Palatabilizante líquido	2,00	2,00	2,00	2,00
Palatabilizante em pó	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto potássio	0,43	0,43	0,43	0,43
Sal comum	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcário	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix min/vit ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto colina 60%	0,40	0,40	0,40	0,40
Antifúngico	0,20	0,20	0,20	0,20
Antioxidante	0,04	0,04	0,04	0,04
Taurina	0,15	0,15	0,15	0,15
Nutrientes	T0	T20	T40	T60
Matéria seca (%)	94,08	94,17	94,33	94,67
Valores corrigidos para matéria seca				
Proteína bruta (%)	32,42	35,19	32,26	32,81
Extrato etéreo em hidrólise ácida (%)	12,18	12,45	12,56	12,98
Fibra bruta (%)	1,50	1,69	1,44	1,45
Matéria mineral (%)	10,98	11,20	11,10	11,20
Cálcio (%)	2,27	2,36	2,19	2,31
Fósforo (%)	1,45	1,40	1,42	1,34
Magnésio (%)	0,17	0,17	0,16	0,17
Sódio (%)	0,29	0,29	0,28	0,25
Potássio (%)	0,64	0,70	0,70	0,63
Ferro (mg/kg)	818,98	846,34	785,54	812,30
Manganês (mg/kg)	76,03	89,36	81,73	88,76
Zinco (mg/kg)	573,98	586,17	602,14	613,71
Cobre (mg/kg)	38,27	37,17	34,98	39,08
Energia bruta (kcal/kg)	4720	4736	4724	4760

¹Adição por quilograma de produto: Ferro 100mg, Cobre 10mg, Manganês 10mg, Zinco 150mg, Iodo 2mg, Selênio 0,3mg, Vitamina A 18000UI, Vit. D 1200UI, Vit. E 200UI, Tiamina 6mg, Riboflavina 10mg, Ácido pantotênico 40mg, Niacina 60mg, Piroxidina 6mg, Ácido fólico 0,30mg, Vit. B12 0,1mg.

Durante todas as fases experimentais os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de aço inox (56 x 58 x 115 cm) com aparato para coleta de fezes e urina (Figura 4). O manejo foi iniciado todos os dias às 8h da manhã, quando as gaiolas eram lavadas e os animais alimentados.

A energia da dieta foi calculada em base de equação de predição (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006) e quantidade de alimento fornecida aos animais baseada na equação de necessidade energética de gatos adultos em manutenção,

calculada pela fórmula: $100 \times (PC)^{0,67} = \text{Kcal/dia}$ (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006). O alimento foi disponibilizado aos animais por 24 horas, o consumo monitorado diariamente. A água foi fornecida *ad libitum*.

No intervalo de 30 dias entre os períodos experimentais, os animais permaneceram soltos em grupos previamente formados nos gatis de convivência. Os gatis possuíam as seguintes dimensões 3,4 m x 8,9 m (cinco gatos alojados), 3,0 m x 9,2 m (seis gatos alojados) e 3,0 m x 6,3 m (três gatos alojados), conforme Figura 4.

Figura 4 - Animais alojados em gaiolas metabólicas e gatis de convivência

Legenda: A – Animais alojados nas gaiolas metabólicas; B – Animais alojados em um dos gatis de convivência.

No período de intervalo os animais receberam alimento comercial isento de prebióticos e probióticos para gatos adultos em manutenção (Mars Brasil, Guararema, Brasil), a qual possuía os seguintes teores nutricionais: 12% de umidade, 30% de proteína bruta, 9% de extrato etéreo, 4% de fibra bruta e 8,5% de matéria mineral, com a seguinte composição: farinha de carne e ossos, farinha de subprodutos de frango, glúten de milho, glúten de trigo, quirera de arroz, milho integral moído, sorgo em grão, gordura de frango, óleo de milho, gordura bovina,

farinha de trigo, taurina, metionina, hidrolisado de fígado de frango, premix vitamínico mineral, BHT e corantes.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E ESCORE FECAL

Para o ensaio de digestibilidade foi utilizado o método de coleta total de fezes e urina. O consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. As fezes e urinas foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento, durante oito dias. As fezes foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise.. A urina foi recolhida em recipiente plástico contendo um mililitro de ácido sulfúrico 1N para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. A urina foi armazenada diariamente em freezer (-15°C) e o volume mensurado ao final do período de coleta.

Ao final do período de coleta as fezes foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal e período, pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (320 SE, Fanem, São Paulo, Brasil) a 55°C durante 72 horas. As fezes pré-secas e as rações foram então moídas em moinho tipo faca, com peneira de 16 mesh para proceder-se as análises laboratoriais. Para a urina foram colocados 30mL em placas de petri e esta foi mantida em estufa de ventilação forçada (320 SE, Fanem, São Paulo, Brasil) a 55°C por 24 horas. Este procedimento foi repetido por três vezes, totalizando 90mL.

As determinações dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB) nas fezes dos animais e alimentos foram realizadas de acordo com a Association of the Official Analytical Chemists (1995). As determinações foram conduzidas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Pirassununga, Brasil). A energia bruta dos alimentos, das fezes e das urinas foi determinada em bomba calorimétrica (1281, PAAR

Instrument Company, Illinois, EUA) no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Jaboticabal, Brasil). As determinações de minerais nas dietas foram realizadas por espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220, Varian, Palo Alto, EUA), de acordo com recomendações de Cantle (1982) no Laboratório de Nutrição Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (Belo Horizonte, Brasil). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e repetidas quando a variação foi superior a 5%.

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes foram determinados de acordo com a fórmula proposta por Pond, Church e Pond (1995).

O escore fecal foi determinado ao longo do período de coleta de fezes para a digestibilidade, aos quais foram atribuídas notas de 1 a 5, conforme metodologia descrita por de-Oliveira et al. (2008), sendo consideradas:

- 1 – fezes líquidas;
- 2 – fezes macias e sem formato definido;
- 3 – fezes macias, bem formadas e úmidas;
- 4 – fezes duras, secas, firmes e bem formadas;
- 5 – fezes muito duras e ressecadas.

4.5 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DE ENTEROBACTÉRIAS E BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS NAS FEZES ATRAVÉS DO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO EM MEIO DE CULTURA SELETIVO

Para determinação do número de UFC de enterobactérias e bactérias ácido-láticas, as fezes foram coletadas de forma asséptica (higienização prévia das gaiolas com água e sabão e posteriormente com álcool 70%, uso de luvas estéreis pelos coletores e armazenamento em coletores universais estéreis), em até 30 minutos após a defecação. As amostras foram homogeneizadas e na sequência pesado 01 grama, com subsequente diluição em 9mL de água peptonada à 0,1% em um prazo máximo de 30 minutos após a coleta do material, e a partir destes tubos foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-4} .

Para contagem de bactérias ácido-láticas, 1mL de cada diluição foi semeada em duplicata em placa de petri descartável contendo ágar Man, Rogosa e Sharp (MRS) (Biologic, São Paulo, Brasil) pela técnica de profundidade (*pour plate*) com sobrecamada, foram semeadas e após solidificação completa foram incubadas em jarras de anaerobiose com sistema gás-pack à 37°C por 72 horas em B.O.D (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

Já para determinação de enterobactérias, 0,1mL de cada diluição foi semeada em duplicata em placa de petri descartável contendo ágar MacConkey (Biologic, São Paulo, Brasil), pela técnica de plaqueamento por superfície (*spread plate*), onde as diluições foram semeadas em meio previamente solidificado, e em seguida espalhada com auxílio de alça de Drigalski, as quais foram incubadas à 37°C por 24 horas em estufa incubadora B.O.D. (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

A contagem total de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada pela técnica de contagem padrão em placas, sendo consideradas todas as colônias que cresceram em cada placa, sem diferenciação dos gêneros bacterianos por teste respiratório, bioquímico ou coloração de Gram, consideradas apenas como bactérias ácido-láticas e enterobactérias, e os valores expressos em log de UFC/g de fezes em base de matéria seca.

4.6 DETERMINAÇÃO DO pH FECAL

A coleta das fezes para determinação do pH fecal ocorreu em até 30 minutos após a defecação dos animais. Sua determinação foi realizada por um peagâmetro digital de bancada (DM-20, Digimed, São Paulo, Brasil) com sensibilidade média de 97,2%. Para tanto, foi realizada introdução direta do eletrodo em uma solução de 1:9 de fezes e água destilada, sendo pesados 02 gramas de fezes, as quais foram diluídas em 18mL de água destilada, e posteriormente mensurado pH da solução.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA, RAMIFICADA E ÁCIDO LÁTICO NAS FEZES

As amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação, sendo homogeneizadas e pesadas. Para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foram utilizadas 03 gramas das fezes diluídas em 9mL de solução ácido fórmico a 16%. Para a determinação do ácido lático, empregou-se mais 03 gramas das fezes diluídas em 9mL de água destilada.

As misturas foram mantidas pelo prazo de sete dias em refrigerador, e posteriormente, centrifugadas por 15 minutos à 15°C em 5.000rpm, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

As concentrações de AGCC e AGCR foram medidas no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (Pirassununga, Brasil) através de cromatografia em fase gasosa (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão), com coluna capilar (Stabilwax®, Restek, Bellefonte, EUA) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, utilizando o método descrito por Erwin, Marco e Emery (1961), adaptado por Getachew, Makkar e Becker (2002).

O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14.500g durante 10 minutos. O sobrenadante (800µL) foi transferido para um frasco seco e limpo com 200µL de ácido fórmico 98-100% PA ACS e 100µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100mM, Chemservice, West Chester, EUA). O padrão externo foi preparado com ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, West Chester, EUA). O software GCSolution® (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão) foi utilizado para os cálculos.

O ácido lático foi mensurado no Laboratório Multiusuário de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Pirassununga, Brasil), segundo

metodologia descrita por Pryce (1969) através de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm; Nova2000UV, Nova Instruments, Piracicaba, Brasil).

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS NAS FEZES

Para realizar as análises do perfil de aminos biogênicas nas fezes dos animais, foram coletadas 05 gramas de fezes, em até 30 minutos após a defecação, as quais foram conservadas em 07mL de ácido tricloroacético a 5%, refrigeradas e enviadas para o Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil). Neste laboratório, as amostras foram centrifugadas (MR23i, Jouan S.A., Saint Herblain, França) a 10.000g por 20 minutos à 4°C, o sobrenadante filtrado em papel filtro qualitativo, e o resíduo extraído por mais duas vezes, empregando-se 7mL e 6mL de ácido tricloroacético a 5%. Os sobrenadantes foram combinados e seu volume registrado para posterior determinação das aminos biogênicas.

As aminos biogênicas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão) por pareamento de íons em coluna de fase reversa (Waters, Barueri, Brasil) e quantificadas por fluorimetria após derivação pós-coluna com oftalaldeído, conforme metodologia descrita por Vale e Glória (1997). A identificação das aminos foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminos da solução padrão. Os padrões de aminos empregados foram: dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina), complexo sulfato creatinina agmatina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina, cloridrato de 2-feniletilamina e triptamina.

4.9 EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE DA MICROBIOTA FECAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

Todas as etapas de desenho de *primers*, construção de curvas padrão, extração de DNA e quantificação de DNA para determinação do número de cópias das bactérias de interesse nas fezes foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia de Anaeróbios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

Para a determinação da microbiota intestinal por esta técnica, nove gramas de fezes foram coletadas de forma asséptica (higienização das gaiolas com água e sabão e posteriormente com álcool 70% e uso de luvas estéreis pelos coletores) em até 30 minutos após a defecação dos animais, divididas em três tubos plásticos estéreis de tampa rosqueável, vedados com parafilme, os quais foram mantidos a -15°C, durante o período em que se aguardava que todos os animais defecassem, passado este período as fezes foram então mantidas a -80°C. Para extração do DNA foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA STOLL Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo recomendações do fabricante, o qual serviu de molde na etapa seguinte de quantificação do DNA bacteriano. Todas as amostras de DNA foram verificadas quanto a sua pureza e integridade, sendo estocada a -80°C até seu uso.

Inicialmente foi realizada a construção da curva-padrão utilizando-se DNA de cepas de referência: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Bifidobacterium infantis* ATCC 35624, e para *Chlamydophila felis*, a vacina FEL-O-VAX – LVK IV® (Zoetis, New Jersey, EUA). A extração do DNA das bactérias foi realizada utilizando-se o kit Easy DNA (Invitrogen do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante.

Após levantamento bibliográfico foram escolhidos os diversos iniciadores específicos (*primers*) para os gêneros, os quais foram reavaliados *in situ*, segundo sequência registrada no GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), sendo os escolhidos apresentados na Tabela 2. Os ciclos de centrifugação foram analisados no programa NetPrimer (Premier Biosoft International, Palo Alto, EUA) para verificar as condições ideais de ampliação, e as especificidades pelo

programa BLAST (National Center for Biotechnology Information – NCBI, Bethesda, EUA), sendo a amplificação realizada em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Hilden, Alemanha).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na detecção quantitativa de diferentes grupos bacterianos em amostras fecais de gatos

Grupos	Iniciadores 5'→ 3'	Amplicon (bp)	Referência
<i>Bifidobacterium</i> spp.	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	125	Penders et al. (2005)
<i>Escherichia coli</i> – <i>Hafnia alvei</i> e <i>Shigella</i> spp.	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	340	Malinen et al. (2003)
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	AAAGATGGCATCATCATTCAAC TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	279	Wang et al. (1994)
<i>Campylobacter</i> spp.	CACGTGCTACAATGGCATAT GGCTTCATGCTCTCGAGTT	108	Lund et al. (2004)
<i>Salmonella</i> spp.	TCGTCATTCCATTACCTACC AAACGTTGAAAACTGAGGA	119	Nam et al. (2005)
<i>Lactobacillus</i> spp.	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	341	Walter, Hertel e Tannock (2001); Heilig et al. (2002); Carroll et al. (2010)
<i>Chlamydophila</i> <i>felis</i>	ATGCTTGTTCCATACATTGGGG TCCTAAAAGAGTTGGGTTCCAGG	129	Helps et al. (2001)

Foi utilizado o sistema SYBR® Green, que ao se ligar à dupla fita de DNA e com a consequente excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite fluorescência de cor verde. As reações de amplificação foram realizadas em duplicata e em volumes finais de 20µL, constituídos de: 10µL de Master Mix SYBR® Green (Promega, São Paulo, Brasil); 0,45µL de iniciador forward (100µM); 0,45µL de iniciador reverse (100µM) e 2nL de DNA. Como controle negativo foi usado água ao invés de DNA, em todas as reações de amplificação.

Em todas as reações de amplificação o termociclador foi programado para 1 hold de 95°C por 10min. Para os gêneros *Bifidobacterium*, *Campylobacter* e *Lactobacillus* foram utilizados 45 ciclos (95°C x 15seg e 58°C x 60seg) e temperatura melting de 58°C. Para *Salmonella* spp. foi usada a temperatura melting de 60°C e 50 ciclos (95°C x 15seg e 60°C x 60seg); e para *Clostridium perfringens*:

40 ciclos (95°C x 15seg e 60°C x 60seg). Para *Chlamydophila felis* foi usada temperatura melting de 55°C e 40 ciclos (95°C x 15seg e 55°C x 60seg); e para o grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* 50 ciclos (95°C x 15seg e 55°C x 60seg).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System statistical software package version 9.2 (SAS Institute, Carolina do Norte, EUA), sendo previamente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo teste F. As variáveis que não atenderam as premissas sofreram transformação logarítmica ou raiz quadrada e foram analisadas pelo PROC GLM do SAS através de regressões polinomiais simples, sendo considerados significativos valores de $P < 0,05$ e tendência a significância valores entre $P > 0,05$ e $P < 0,10$. O escore fecal e o consumo de PCL foram analisados por estatística não paramétrica pelo PROC NPAR1WAY do SAS pelo teste de KRUSKAL-WALLIS.

$$Y_{ijk} = u + T_i + P_j + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = valor observado na parcela; U = constante inerente a toda parcela; T_i = efeito do tratamento; P_j = efeito do tempo (período) e e_{ijk} = erro do modelo

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PESO CORPORAL, CONSUMO DE MATÉRIA SECA, PRODUÇÃO FECAL E URINÁRIA, ESCORE DAS FEZES, CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) para o peso corporal dos animais nos tratamentos experimentais no período inicial ($4,40\pm 1,05\text{kg}$), avaliação importante para demonstrar que a distribuição dos mesmos foi adequada. Da mesma forma, observou-se que houve manutenção do peso corporal dos animais entre o início do experimento e na pesagem final ($4,61\pm 1,15$; $p>0,05$), o que é importante, já que se trabalhou com gatos adultos em manutenção, não sendo desejável aumento ou perda de peso, e em condições experimentais a perda ou ganho de peso poderia significar que um grupo recebeu mais ou menos de determinado nutriente, o que poderia interferir no resultado, ou mascarar a causa do efeito encontrado.

Na Tabela 3 estão apresentados os dados de consumo de alimento em base de matéria seca, produção fecal e urinária, bem como seus valores corrigidos para peso corporal e peso metabólico, avaliados durante o período de coleta para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes.

Tabela 3 - Consumo de matéria seca, produção fecal e urinária dos animais nos tratamentos experimentais

Variáveis	T0	T20	T40	T60	EPM	Linear	Quadrática
Consumo de matéria seca							
Consumo de MS (gramas/dia)	59,20	62,13	59,78	67,02	3,47	0,4523	0,8442
Consumo de MS em base de peso corporal (gramas/kg/dia)	13,00	15,32	14,55	13,74	0,63	0,9965	0,2830
Consumo de MS em base de peso metabólico (gramas/kg ^{0,67} /dia)	21,26	24,13	23,09	23,12	0,97	0,7512	0,5361
Produção fecal							
Produção fecal (gramas/MN/dia)	36,21	39,01	33,29	45,73	4,13	0,5443	0,6086
Produção fecal em base de peso corporal (gramas/MN/kg/dia)	7,62	9,44	8,22	9,28	0,74	0,6615	0,7845
Produção fecal em base de peso metabólico (gramas/MN/kg ^{0,67} /dia)	12,63	14,96	12,99	15,66	1,25	0,5799	0,9461
Produção fecal em base do consumo (gramas/MN/100gramas de alimento MS)	57,85	61,10	55,30	64,83	3,21	0,5350	0,6507
Produção fecal (gramas/MS/dia)	14,02	15,19	13,03	15,85	3,47	0,6392	0,8581
Produção fecal em base de peso corporal (gramas/MS/kg/dia)	3,02	3,72	3,21	3,24	0,19	0,9712	0,4507
Produção fecal em base de peso metabólico (gramas/MS/kg ^{0,67} /dia)	4,97	5,87	5,07	5,46	0,31	0,9096	0,6571
Produção urinária							
Produção de urina (mL/dia)	47,76	43,45	58,27	59,06	4,10	0,2237	0,7662
Produção de urina em base de peso corporal (mL/kg/dia)	10,83	11,04	14,83	12,56	1,19	0,4472	0,6195
Produção de urina em base de peso metabólico (mL/kg ^{0,67} /dia)	17,52	17,22	23,21	20,88	1,73	0,3759	0,8075
Produção de urina em base do consumo (mL/100gramas de alimento MS)	81,84	71,86	102,05	92,92	7,91	0,3555	0,9448

MS= matéria seca; MN= matéria natural; EPM= erro padrão da média; significância p<0,05.

Pelos dados apresentados na tabela 3 é possível verificar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) para o consumo de alimento em base de matéria seca e consumo de matéria seca corrigido para peso corporal e metabólico, para a produção fecal em base de matéria natural e seca, corrigida para o peso corporal e metabólico e em base do consumo de alimento, bem como para a produção de urina, corrigida para peso corporal e metabólico e em base de consumo de alimento para os animais nos tratamentos experimentais.

O consumo médio dos animais manteve-se em 82,60%; 92,72%; 89,85% e 90,11% da necessidade energética diária para os tratamentos T0, T20, T40 e T60, respectivamente. Este dado é bastante importante ao considerar a recomendação de Carciofi, de-Oliveira e Vasconcellos (2006) que citam que em testes de digestibilidade os animais não devem consumir acima de 25% das exigências energéticas, nem abaixo de 75%, pois pode comprometer os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes.

De forma similar a este achado, Gomes (2009) não encontrou diferença significativa no consumo de matéria seca de cães que receberam níveis crescentes de PCL. Por outro lado, Aquino et al. (2010) observaram efeito quadrático no consumo de matéria seca de gatos suplementados com PCL. Com relação ao último trabalho é importante salientar que os autores trabalharam com dietas secas hidratadas com água, o que poderia alterar o padrão de consumo dos animais, em comparação ao presente estudo, o qual teve a inclusão da PCL diretamente no processo de extrusão das dietas experimentais.

Os resultados da suplementação de prebióticos sobre a produção fecal em cães e gatos é bastante variável, o que pode estar relacionado à fonte de prebiótico, concentração utilizada, bem como a matriz nutricional da dieta, sendo que os efeitos dos prebióticos sobre a produção fecal estaria relacionado à alteração na digestibilidade dos nutrientes e à fermentação dos aditivos, com aumento na produção AGCC, que modulariam a absorção de água por efeito osmótico. No entanto, tal efeito seria dose dependente, ou seja, em doses extremamente baixas ou altas é possível que os AGCC contribuam para o aumento do teor de água nas fezes (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Resultados similares ao presente estudo com cães suplementados com PCL são citados por Swanson et al. (2002) e Félix et al. (2010). Em contrapartida, Middelbos et al. (2007) encontraram comportamento quadrático para a produção

fecal de cães suplementados com PCL e Gomes (2009) observou aumento linear. A discrepância do presente trabalho em relação à Middelbos et al. (2007) e Gomes (2009) pode estar relacionada a diferença interespecie e das dietas, já que as doses utilizadas por Gomes (2009) (0%; 0,15%; 0,30% e 0,45%) e Middelbos et al. (2007) (0%; 0,05%; 0,25%; 0,45% e 0,65%) foram próximas às utilizadas no presente trabalho. Em relação à diferença interespecífica, apesar dos felinos apresentarem menor comprimento do TGI em relação aos cães (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006), a microbiota dos gatos possui maior número de gêneros bacterianos anaeróbios (JOHNSTON; LAMPORT; BATT, 1993), bem como parece haver maior produção de AGCC em comparação aos cães (SUNVOLD et al., 1995a, b), fato que poderia refletir em maior taxa de reabsorção de água intestinal ocasionada pelos AGCC. Além disso, a formação de tricobezoaes e o elevado conteúdo de matéria mineral das dietas experimentais podem ter mascarado a maior produção fecal associada à porcentagem de água.

Na tabela 4 estão apresentados os valores de escore fecal médios dos animais nos tratamentos experimentais, bem como sua distribuição percentual dentro da escala utilizada.

Tabela 4 - Médias do escore fecal dos animais e distribuição percentual do escore fecal dentro dos tratamentos experimentais

Variáveis	T0	T20	T40	T60	p¹
Escore fecal	3,01	3,09	2,96	2,56	0,6644
Distribuição percentual do escore fecal dentro dos tratamentos experimentais					
Escala	T0	T20	T40	T60	
1	5,41	20,00	3,23	17,07	
2	27,03	2,50	38,71	24,39	
3	43,24	40,00	35,44	51,22	
4	24,32	32,50	9,68	7,32	
5	0,00	5,00	12,90	0,00	

1 – fezes líquidas; 2 – fezes macias e sem formato definido; 3 – fezes macias, bem formadas e úmidas; 4 – fezes duras, secas, firmes e bem formadas; 5 – fezes muito duras e ressecadas. significância $p < 0,05$; ¹Teste de Kruskal-Wallis.

Pode-se verificar que não houve diferença ($p > 0,05$) para o escore fecal dos animais nos diferentes tratamentos experimentais, os quais apresentaram média geral de 2,91, ou seja, próximo ao valor ideal (3). Na distribuição dos escores fecais dentro das escalas, observou-se que no T0, T20 e T60 a maior parte das fezes

encontrou-se no escore 3, somente no tratamento T40 houve maior proporção de fezes no escore 2.

Os dados de escore fecal deste trabalho vão ao encontro aos achados de Aquino et al. (2010) na suplementação de PCL para gatos e Strickling et al. (2000); Swanson et al. (2002); Zentek, Marquat e Pietrzak (2002) e Middelbos et al. (2007) em cães.

Efeitos positivos da PCL sobre o escore fecal foram relatados por Félix et al. (2010) em cães. Gomes (2009) por sua vez encontrou tendência a comportamento quadrático, sendo encontrada piora nos tratamentos intermediários (0,15% e 0,30% de PCL) frente aos extremos (0% e 0,45% de PCL), entretanto de acordo com a autora, tal diferença foi pequena e de pouca significância prática.

Apesar da alta variabilidade e subjetividade, o escore fecal é uma medida bastante importante a ser avaliada em pesquisas com prebióticos, já que considera de forma simples a qualidade das fezes e trata-se de uma medida próxima à avaliação utilizada pelos proprietários de animais de companhia na decisão de compra por determinado alimento comercial. Contudo, além de sua intrínseca variabilidade interindividual, o escore fecal sofre grande variação de acordo com a fonte e dosagem prebiótica e a matriz nutricional da dieta.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados de consumo médio diário dos nutrientes e os coeficientes de digestibilidade aparente avaliados no presente trabalho, bem como os valores de energia digestível e metabolizável aparente, avaliados durante o período de coleta para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes.

Tabela 5 - Consumo de PCL e de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente, energia digestível e metabolizável das dietas experimentais

Variáveis	T0	T20	T40	T60	EPM	Linear	Quadrática
Consumo médio diário de nutrientes (g/animal/dia)							
Parede celular de levedura	0,00	0,12	0,24	0,40	-	<0,0001 ¹	
Matéria orgânica	52,70	55,17	53,15	59,52	3,47	0,5652	0,7669
Proteína bruta	19,19	21,87	19,29	21,99	1,17	0,6274	0,9900
Extrato etéreo em hidrólise ácida	7,21	7,73	7,51	8,70	0,44	0,3461	0,7171
Fibra bruta	0,89	1,05	0,86	0,97	0,06	0,9165	0,8219
Matéria mineral	6,50	6,96	6,64	7,50	0,39	0,5015	0,8022
Extrativos não nitrogenados	29,14	28,37	29,08	31,63	1,65	0,6352	0,6424
Energia bruta	279,43	294,25	282,39	318,99	16,47	0,5309	0,7561
Coeficientes de digestibilidade aparente							
Matéria seca	76,68	75,74	78,25	76,90	0,51	0,5681	0,8645
Matéria orgânica	83,27	82,78	84,33	83,06	0,46	0,9226	0,7110
Proteína bruta	82,61	82,36	84,07	81,45	0,64	0,7223	0,3938
Extrato etéreo em hidrólise ácida	85,37	85,22	87,42	87,27	0,57	0,1483	0,9993
Fibra bruta	21,20	33,76	28,25	27,08	1,99	0,5970	0,0792 ²
Matéria mineral	23,20	19,94	29,56	28,02	1,29	0,0305 ³	0,6923
Extrativos não nitrogenados	86,93	86,59	87,31	86,75	0,52	0,9469	0,9488
Energia Bruta (EB)							
Coeficiente de digestibilidade da EB	82,90	82,38	84,37	82,97	0,47	0,7018	0,6766
Coeficiente de metabolização da EB	74,57	75,42	73,78	73,67	0,76	0,5061	0,7889
Energia digestível aparente (kcal/kg)	3913	3902	3985	3949	22,15	0,4174	0,8138
Energia metabolizável (kcal/kg)	3520	3572	3485	3506	35,99	0,6596	0,8616

EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$; ¹Teste de Kruskal-Wallis; ² $R^2 = 32,49\%$; ³ $R^2 = 36,56\%$.

Pelos dados apresentados na tabela 5, pode-se verificar que não houve diferença significativa no consumo médio diário dos nutrientes pelos animais ($p>0,05$), com exceção do consumo de PCL, que como esperada apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,0001$) quando avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, observou-se efeito da PCL apenas sobre a matéria mineral, que apresentou aumento linear ($p=0,0305$; $R^2=36,56\%$) e tendência a efeito quadrático para a fibra bruta ($p=0,0792$; $R^2=32,49\%$).

O achado com a matéria mineral pode estar relacionado à produção de ácidos orgânicos, ionização dos minerais, e consequente aumento em sua absorção. De acordo com Sekhon e Jairath (2010), *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* são importantes bactérias probióticas associadas ao aumento da absorção de minerais e vitaminas pelo hospedeiro. Foi verificado por Beynen et al. (2002) que a suplementação de oligofrutose elevou *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus spp.*, bem como a absorção de cálcio e magnésio em cães. No entanto, são sugeridos futuros trabalhos com avaliações em minerais específicos, já que a metodologia de matéria mineral considera o resíduo da combustão completa da matéria orgânica e apresenta apenas uma orientação da quantidade de minerais da amostra (SILVA; QUEIROZ, 2002).

Com relação ao coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta, o achado do presente trabalho difere dos de Middelbos et al. (2007) que citam que o aumento da biomassa microbiana intestinal pode repercutir em redução da digestibilidade aparente da proteína com a inclusão de prebiótico e Swanson et al. (2002) que citam que o mananoligossacarídeo presente na PCL poderia se ligar a proteína da dieta, o que reduziria sua digestibilidade.

Para o coeficiente de digestibilidade aparente da fibra bruta, tal achado corrobora Middelbos et al. (2007), que observaram efeito cúbico na digestibilidade da fibra insolúvel, com o maior coeficiente encontrado na inclusão de 0,25% de PCL. Gomes (2009) encontrou efeito quadrático para o coeficiente de digestibilidade da fibra bruta, sendo observada maior digestibilidade na inclusão de 0,15% de PCL. Destaca-se que no presente trabalho a digestibilidade mais elevada da fibra bruta foi observada na inclusão de 0,2% de PCL, o que esteve próximo aos achados destes autores.

5.2 MICROBIOTA FECAL

Na Tabela 6 são apresentados os efeitos da inclusão de PCL sobre a composição fecal de enterobactérias e bactérias ácido-láticas, avaliadas pela técnica de cultivo em meio de cultura seletivo, bem como *Bifibobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia felis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* – *Hafnia alvei* e *Shigella spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Salmonella spp.* avaliadas pela técnica de PCR em tempo real.

Tabela 6 - Composição microbiana das fezes avaliadas através da técnica de cultivo em meio de cultura seletivo e PCR em tempo real dos animais nos tratamentos experimentais

Variáveis	T0	T20	T40	T60	EPM	Linear	Quadrática
Bactérias avaliadas por cultivo em meio de cultura seletivo (log/UFC/g em base de matéria seca)							
Bactérias ácido-lático	4,69	4,61	4,38	4,75	0,17	0,8581	0,6011
Enterobactérias	5,68	5,38	5,33	5,32	0,16	0,3718	0,6502
Bactérias avaliadas pela técnica de PCR em tempo real (log/copies/g em base de matéria seca)							
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,54	7,18	7,59	8,00	0,19	0,0152	0,7548
<i>Campylobacter</i> spp.	2,98	2,91	2,83	3,08	0,16	0,7270	0,7833
<i>Chlamydia felis</i>	ND	ND	ND	ND	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	5,78	5,43	4,97	4,90	0,15	0,0371	0,6327
<i>Escherichia coli</i> – <i>Hafnia alvei</i> e <i>Shigella</i> spp.	3,66	1,98	2,57	4,65	0,42	0,2494	0,0211
<i>Lactobacillus</i> spp.	4,61	5,06	5,15	5,88	0,18	0,0299	0,6663
<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND	ND	ND	-	-	-

EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$; ND = não detectado; *Bifidobacterium* spp. $R^2 = 27,06\%$; *Clostridium perfringens* $R^2 = 32,08\%$; grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella* spp. $R^2 = 30,86\%$; *Lactobacillus* spp. $R^2 = 33,94\%$.

Pode-se verificar na tabela 6 que a contagem fecal de enterobactérias, bactérias ácido-láticas, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia felis* e *Samonella spp.*, não foram moduladas ($p>0,05$) pela PCL, enquanto que *Bifidobacterium spp.* ($p=0,0225$; $R^2=27,06\%$) e *Lactobacillus spp.* ($p=0,0134$; $R^2=33,94\%$) apresentaram significativo aumento linear, *Clostridium perfringens* redução linear ($p=0,0225$; $R^2=32,08\%$) e grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* comportamento quadrático ($p=0,0225$; $R^2=30,86\%$)

Com relação às bactérias potencialmente patogênicas, apenas *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens* e o grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* estiveram presentes na microbiota fecal dos animais, enquanto que as demais estiveram ausentes em 100% das amostras avaliadas. Ao avaliar em conjunto dados de experimento piloto (quatro amostras) e os dados do presente trabalho (vinte e oito amostras), observou-se que nenhuma das amostras apresentou *Salmonella spp.* e *Chlamydia felis* (ausentes em 100%); 71,9% apresentaram grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* (23 de 32 amostras); 96,9% (31 de 32 amostras) *Lactobacillus spp.* e *Campylobacter spp.* e 100% *Bifidobacterium spp.* e *Clostridium perfringens*.

A ausência de *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* em 28,1% das amostras não é clara. Apesar de Handl et al. (2011) observarem *E. coli* em apenas três de doze felinos avaliados, esta bactéria parece tratar-se de uma espécie indígena da microbiota de felinos, conforme estudo de Ritchie et al. (2010), os quais verificaram que o filo *Proteobacteria* compreendia 7,9% da microbiota de felinos, destes 6,7% compreendidos por gêneros semelhantes a *E. coli*. No sequenciamento de nova geração os resultados são apresentados em base de percentual, com isso o PCR em tempo real apresentaria maior sensibilidade para quantificação bacteriana.

Para *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, Ritchie et al. (2010) relatam que estas podem não ser abundantes na microbiota de felinos, mas diferente do que ocorre em sequenciamento de nova geração, sua quantificação é possível com primers desenhados especificamente para estes gêneros bacterianos, o que ocorreu no presente estudo. Já o grupo *Clostridium spp.* apresenta relativa frequência nas fezes de felinos (DESAI et al., 2009; RITCHIE et al., 2010; HANDL et al., 2011), sendo verificado que nove dos dozes felinos possuíam *C. perfringens* nas fezes (HANDL et al., 2011).

Com relação ao *Campylobacter spp* tem sido relatado que a mananoproteína presente na PCL seria capaz de reduzir a aderência e invasão de *Campylobacter*

jejuni em células intestinais (GANAN et al., 2009), no entanto, os resultados da presente pesquisa apontam que a PCL não alterou a contagem nas fezes de *Campylobacter spp.* Para *Chlamydia felis*, diversos trabalhos conduzidos com filogenética não apresentam a frequência do gênero na microbiota de cães e gatos, com exceção apenas do estudo publicado por Tun et al. (2012) que localizaram a presença do filo *Chlamydiae/Verrucomicrobia*, com porcentagem bastante reduzida (0,3%).

A explicação para a ausência de *Salmonella spp.* nas fezes dos animais em todos os tratamentos experimentais pode estar relacionada a baixa prevalência do gênero nos felinos, conforme achado de Van Immerseel et al. (2004), os quais observaram que apenas um gato saudável de 278 avaliados apresentou positividade para o gênero bacteriano em avaliação pela técnica de PCR. Lee (2003) confirmou a baixa prevalência de *Salmonella spp.* em gatos: dos 94 animais avaliados apenas nove foram positivos. Com cães, Gomes (2009) também relatou ausência de *Salmonella spp.* nas fezes dos animais, já Saad e França (2010) observaram que cães alimentados com alimento úmido, natural cru, natural aquecido e alimento comercial extrusado apresentaram positividade para *Salmonella spp.* em todos os alimentos, contudo, diversos fatores podem estar relacionados à contaminação por *Salmonella spp.*, como o consumo de alimento, o ambiente em que o animal é mantido, o *status* imunológico, a virulência da cepa ao qual o animal é exposto, bem como a competição com a microbiota comensal (CARTER; QUINN, 2000).

Em relação à modulação de *Clostridium perfringens* e do grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* pela PCL destaca-se que tais dados vão ao encontro dos de Grieshop et al. (2004) que observaram redução em *E. coli* avaliada pela metodologia de cultivo em meio de cultura seletivo em cães. Strickling et al. (2000) relataram redução na contagem de *Clostridium perfringens* com a inclusão de PCL em dietas para cães, ao avaliar a microbiota pela técnica de plaqueamento, em comparação a outras fontes prebióticas (FOS e XOS), contudo os autores não avaliaram o efeito da PCL em relação ao grupo controle. Middelbos et al. (2007) observaram tendência a comportamento cúbico para *Clostridium perfringens*, com número reduzido nas inclusões de 0% e 0,45% de PCL para cães, e redução linear em *E. coli* quando avaliado pela técnica de cultivo em meio de cultura seletivo, já quando os autores avaliaram pela técnica de PCR em tempo real a *E. coli* apresentou apenas tendência a redução. Gouveia et al. (2013) descreveram que cães filhotes suplementados com

PCL e infectados experimentalmente com *E. coli* apresentaram recuperação mais rápida em relação ao grupo controle.

Contudo os dados disponíveis até o momento são controversos e contrastam com trabalhos conduzidos com cães e gatos, que avaliaram a microbiota fecal através da técnica de plaqueamento e não observaram efeito do aditivo em cães e gatos (SWANSON et al., 2002; GOMES, 2009; AQUINO et al., 2012), bem como em avaliação através de PCR em tempo real com misturas prebióticas baseadas em celulose, FOS e PCL (MIDDELBOS; FASTINGER; FAHEY JR., 2007).

De acordo com Calabrò et al. (2013), a PCL possui fermentação lenta e moderada produção de gás quando comparada a outras fontes de fibras fermentáveis comumente utilizadas como fontes prebióticas. Desta forma, seu mecanismo de ação sobre a modulação da microbiota fecal não estaria relacionado apenas à produção de ácidos orgânicos e redução do pH intestinal, e sim à aglutinação de cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. montevideo*, *S. give*, *S. kedougou*, e *S. dublin* (SPRING et al., 2000), devido a constituição particular destas bactérias, que apresentam resíduos de D-manose em suas fímbrias, o que leva à ligação destas ao MOS, aglutinação e consequente eliminação do trato gastrintestinal (BOMBA et al., 2006). Dado confirmado por Borowsky, Corção e Cardoso (2009) que ao trabalharem com 108 cepas de *Salmonella spp.* isoladas de suínos, observaram que 28,7% expressavam fímbria tipo 1, sendo que destas 74,2% apresentaram forte aglutinação *in vitro* com o mananoligossacarídeo, 9,6% fraca aglutinação, enquanto apenas 16,2% não apresentaram aglutinação.

Os achados com o grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* e *Clostridium perfringens* parecem ter relação com a elevação em *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, já que a fermentação moderada da PCL, principalmente na parte distal do TGI dos animais e a capacidade de aglutinação de bactérias que expressam fímbria tipo I, como *E. coli* e *Samonella spp.* pela PCL, repercutiu em efeitos positivos nos gêneros bacterianos potencialmente benéficos, como *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* Neste sentido, Cheikhyoussef et al. (2008) destacaram que *Bifidobacterium spp.* são capazes de produzir substâncias, como sideróforos e bactericinas, que apresentam espectro antimicrobiano sobre *Clostridium perfringens*, *E. coli* e *Salmonella spp.*, de forma semelhante às bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus acidophilus* (GARCIA et al., 2006).

O aumento linear observado em *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, corrobora alguns estudos com cães, como Grieshop et al. (2004) que observaram elevação de *Bifidobacterium spp.*, Swanson et al. (2002) que observaram tendência a aumento de *Lactobacillus spp.*, sendo que em ambos os estudos foi utilizada a técnica de cultivo em meio de cultura seletivo, e Middelbos et al. (2007) que observaram comportamento cúbico para *Lactobacillus spp.*, com número mais elevado no teor de 0,45% de PCL, em avaliação através de PCR em tempo real. Entretanto discordam de Strickling et al. (2000) e Gomes (2009) que não observaram efeito do aditivo sobre tais gêneros bacterianos e a explicação pode estar relacionada a técnica de cultivo em meio de cultura seletivo utilizada pelos autores para determinar a microbiota fecal, apesar de contrastar com Swanson et al. (2002) e Grieshop et al. (2004) que também trabalharam com tal metodologia.

É importante ressaltar que esta possível fermentação da PCL, e elevação de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* vão ao encontro do achado *in vitro* de Ganán et al. (2012), os quais relataram que as mananoproteínas presentes na PCL favorecem a multiplicação e a aderência de bactérias lácticas à mucosa intestinal, e com isso outras bactérias ácido-láticas além do *Lactobacillus spp.* podem ter modulado a microbiota de forma que os gêneros potencialmente benéficos tenham sido elevados.

Com relação aos achados na técnica de plaqueamento, é importante destacar que na quantificação total de enterobactérias é possível que a modulação da PCL sobre bactérias que expressam fímbrias tipo 1 fique comprometida, já que de acordo com Adegbola e Old (1987) apesar deste tipo de fímbria ser comum em *Enterobacteriaceae* devido a sua ampla distribuição entre os gêneros e espécies de desta família, esta não é uma característica geral para o grupo, onde há formação de colônias com múltiplas fímbrias, portanto, são necessários trabalhos que considerem os gêneros e/ou espécies bacterianas. Já para as bactérias ácido-láticas (dentre as principais: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*; MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997) os dados do presente trabalho corroboram Aquino et al. (2012) que também não observaram efeito do aditivo sobre as mesmas, bem como em enterobactérias, grupo no qual os autores observaram que *E. coli* representava 72,30% em avaliação de fezes de felinos.

É importante destacar que no presente trabalho optou-se em utilizar a técnica de cultivo em meio de cultura seletivo para uma avaliação ampla de bactérias

benéficas e potencialmente patogênicas, sem considerar gêneros e/ou espécies específicas por meio de testes presuntivos (testes respiratórios, bioquímicos e coloração de Gram). Como tais meios de cultura suportam o crescimento de diversos gêneros bacterianos, sua identificação através de testes presuntivos é de extrema importância. Com isso, a comparação dos dados a outros trabalhos que tenham avaliado a PCL e/ou outras substâncias prebióticas em cães e gatos torna-se difícil e assim, limitada aplicação prática.

5.3 PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO NAS FEZES

Na Tabela 7 estão apresentados os dados de pH fecal e concentração de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.

Tabela 7 - Média do pH e concentração de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada nas fezes dos animais nos tratamentos experimentais

Variáveis	T0	T20	T40	T60	EPM	Linear	Quadrática
pH fecal							
Ácido láctico (µmol/g em base de MS)	6,68 5,36	6,54 4,06	6,53 4,82	6,35 6,71	0,06 0,62	0,1998 0,4555	0,8804 0,2228
Ácidos graxos de cadeia curta (µmol/g em base de matéria seca)							
Ácido acético	110,28	215,85	155,05	218,77	15,28	0,0854	0,4894
Ácido propiônico	62,95	103,05	83,87	107,97	6,77	0,1584	0,5793
Ácido butírico	23,15	60,67	45,89	74,84	5,51	0,0075	0,4843
AGCC totais	196,38	379,57	284,81	401,58	26,36	0,0612	0,5267
Ácidos graxos de cadeia ramificada (µmol/g em base de matéria seca)							
Ácido valérico	14,63	21,03	21,52	28,66	1,77	0,0465	0,7624
Ácido isovalérico	7,01	11,03	8,20	8,27	0,90	0,7609	0,3406
Ácido isobutírico	5,38	8,91	6,36	5,79	0,58	0,8515	0,0801
AGCR totais	27,02	40,96	36,07	42,72	2,51	0,0986	0,5645

EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$; Ácido acético $R^2 = 39,70\%$; Ácido butírico $R^2 = 48,11\%$; AGCC totais $R^2 = 38,21\%$; Ácido valérico $R^2 = 40,51\%$; Ácido isobutírico $R^2 = 42,41\%$; AGCR totais $R^2 = 46,03\%$.

Pelos dados apresentados na Tabela 7 pode-se verificar que não houve diferença significativa para o pH fecal e para a concentração fecal dos ácidos láctico, propiônico e isovalérico ($p > 0,05$), já o ácido butírico ($p = 0,0075$; $R^2 = 48,11\%$) e ácido valérico ($p = 0,0465$; $R^2 = 40,51\%$) apresentaram aumento linear significativo, o ácido acético ($p = 0,0854$; $R^2 = 39,70\%$), AGCC totais ($p = 0,0612$; $R^2 = 38,21\%$) e AGCR totais ($p = 0,0986$; $R^2 = 46,03\%$) apresentaram tendência a aumento, enquanto que o ácido isobutírico apresentou tendência a aumento quadrático ($p = 0,0801$; $R^2 = 42,41\%$).

Esperava-se que a PCL reduzisse o pH das fezes dos animais, principalmente ao observar a significância para a concentração fecal dos AGCC e AGCR. Contudo, de forma similar Aquino et al. (2013) não observaram diferença no pH fecal de gatos suplementados com PCL, bem como Félix et al. (2010) em estudo com cães que receberam baixas doses (0,1%) do aditivo. Deve-se levar em conta que o pH parece ser um parâmetro de relativa variabilidade, já que alguns autores observaram aumento no pH fecal com a inclusão do aditivo (SWANSON et al., 2002; GOMES, 2009), comportamento cúbico (MIDDELBOSS et al., 2007), e redução significativa em comparação ao períodos antes ou depois da suplementação (ZENTEK; MARQUAT; PIETRZAK, 2002).

Para o ácido láctico não foi verificado efeito da PCL, o que corrobora Swanson et al. (2002) que também não observaram efeito do aditivo sobre a concentração de ácido láctico nas fezes de cães, mesmo com tendência a aumento em *Lactobacillus spp.*

O aumento na produção de AGCC, principalmente butírico e acético, apresenta íntima relação com o aumento na *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, os quais apresentam como produtos finais do metabolismo fermentativo, principalmente: láctico, acético e formato (LOUIS et al., 2007; MAUKONEN, 2012). De acordo com Belenger et al. (2006), o ácido láctico e acético produzido pelas *Bifidobacterium* servem como substratos para a produção de ácido butírico, neste sentido, Sunvold et al. (1995a) observaram em estudo *in vitro* que a concentração de ácido láctico responde de forma contrária a concentração de AGCC ao longo do tempo, enquanto o láctico reduz com o tempo, os AGCC elevam-se.

Além da produção de lactato, a síntese de ácido acético por *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* pode também ter-se traduzido no achado com o ácido butírico, já que tem sido relatado que altas concentrações de acetato estimulam a síntese de CoA-transferase em bactérias butíricas, o que levaria a aumento na

síntese de ácido butírico e detoxicação do excesso de ácido acético (LOUIS et al., 2007).

Com relação aos AGCC e AGCR totais, pode-se observar que a inclusão de PCL na dieta repercutiu em tendência ao aumento linear, o que está diretamente associado ao aumento nos ácidos acético, butírico e valérico, com verificação de elevação em 2,05 e 1,58 vezes para AGCC e AGCR total do T0 para o T60, respectivamente, o que contrasta com Gomes (2009) que observou elevação do butirato pela PCL em cães, contudo sem efeito para o total de AGCC.

Para aos AGCR, o ácido valérico, oriundo dos aminoácidos leucina e isoleucina, e isobutírico, oriundo da valina (NAKAE; ELLIOT, 1965) apresentaram comportamento linear e quadrático, respectivamente, ou seja, houve elevação na degradação de substrato à base de valina com posterior redução, enquanto o subproduto de leucina e isoleucina elevaram-se linearmente com a inclusão de PCL.

Na tabela 8 está apresentada a concentração fecal de aminas biogênicas.

Tabela 8 - Concentração de aminas biogênicas nas fezes dos animais nos tratamentos experimentais

Variáveis	T0	T20	T40	T60	EPM	Linear	Quadrática
$\mu\text{mol/g}$ em base de matéria seca							
Putrescina	1,35	3,80	4,59	4,46	0,52	0,0276 ¹	0,2016
Cadaverina	4,89	7,99	10,64	11,13	0,80	0,0036 ²	0,3524
Histamina	0,52	0,80	0,91	1,33	0,10	0,0183 ³	0,4413
Tiramina	0,18	0,27	0,10	0,25	0,05	0,4725	0,3287
Espermidina	0,53	0,75	0,61	0,65	0,04	0,5870	0,2914
Feniletilamina	0,01	0,01	0,01	0,02	0,002	0,9998	0,3763
Triptamina	0,01	0,02	0,01	0,02	0,002	0,3349	0,7384
Aminas biogênicas totais	7,51	13,65	16,87	17,85	1,25	0,0024 ⁴	0,2754

EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$; ¹Putrescina $R^2=36,15\%$; ²Cadaverina $R^2=34,55\%$; ³Histamina $R^2=43,19\%$; ⁴Aminas biogênicas totais $R^2=41,99\%$.

Pode-se verificar na tabela 8 que não houve diferença significativa na concentração fecal de tiramina, espermidina, feniletilamina e triptamina ($p > 0,05$), entretanto putrescina ($p=0,0276$; $R^2=36,15\%$) cadaverina ($p=0,0036$; $R^2=34,55\%$), histamina ($p=0,0183$; $R^2=43,19\%$) e aminas biogênicas totais ($p=0,0024$; $R^2=41,99\%$) apresentaram aumento linear com a inclusão de PCL.

Ao relacionar AGCC, AGCR e aminas biogênicas é possível observar que houve elevação tanto em gêneros bacterianos sacarolíticos como proteolíticos com a inclusão de PCL na dieta dos animais. Noack et al. (1998) observaram aumento na concentração de cadaverina e putrescina em ratos que receberam dietas suplementadas com fibra, da mesma forma, Propst et al. (2003) encontraram tendência a aumento na concentração de putrescina, cadaverina, espermidina e total de aminas biogênicas totais em cães suplementados com oligofrutose, bem como Middelbos; Fastinger e Fahey Jr. (2007) que observaram aumento de putrescina em cães que receberam *blends* de prebióticos com PCL.

Ao avaliar o efeito de diferentes fibras para gatos, Barry et al. (2010) observaram que as fontes com maior grau de fermentabilidade repercutiram em elevada concentração de aminas biogênicas, de acordo com os autores, como a microbiota intestinal de felinos é composta majoritariamente por bactérias proteolíticas, a modulação pelos substratos, com aumento em gêneros sacarolíticos não seria suficiente para atenuar a degradação de compostos nitrogenados em aminas biogênicas. De forma similar, Middelbos, Fastinger e Fahey Jr. (2007) citam

que a fermentabilidade de carboidrato parece ser acompanhada pela fermentação de compostos nitrogenados, sendo que prebióticos de rápida fermentação seriam utilizados por bactérias no cólon proximal, em seguida as bactérias do cólon distal continuariam a fermentar aminoácidos (MIDDELBOS; FASTINGER; FAHEY Jr., 2007; BARRY et al., 2010; KANAKUPT et al., 2011).

As principais bactérias que possuem descarboxilase e seriam capazes de produzir aminas biogênicas, são *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, entre outras (BARDÓCZ, 1995; SHALABY, 1996; BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999) e os aminoácidos associados ao aumento em histamina, cadaverina e putrescina, moduladas no estudo, são histidina, ornitina e lisina (SHALABY, 1996).

Apesar do grupo *E. coli*, *Hafnia alvei* e *Shigella spp.* ter sido modulada com comportamento quadrático, com redução nos tratamentos T20 e T40 e Bover-Cid e Holzapfel (1999) terem destacado algumas *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* e *Klebsiella*) como importantes produtoras de putrescina e cadaverina, espécies de *Lactobacillus* parecem também estar relacionadas em menor extensão à produção destas aminas (BOVER; HOLZAPFEL, 1999; BOVER-CID et al., 2001), o que pode explicar em partes os achados com a cadaverina e a putrescina no presente estudo.

Para histamina, Khoohdar et al. (2011) relataram produção por *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Clostridium perfringens* e *Morganella morgans*, no entanto é importante ressaltar que as carboxilases presentes nos microrganismos não são muito específicas e sua atividade é característica para as espécies e cepas bacterianas (BARDÓCZ, 1995).

Em avaliação metabólica da microbiota fecal de cães que receberam polpa de beterraba, Swanson et al. (2011) relataram que estes animais apresentaram elevação em genes associados a biossíntese proteica em comparação ao grupo controle, o que os autores atribuem ao aumento na atividade e/ou multiplicação bacteriana frente a disponibilidade de substrato, sendo necessários estudos multidisciplinares que aliem técnicas moleculares, às clássicas avaliações *in vitro* e estudos aprofundados do metabolismo microbiano.

De forma geral, pode-se verificar que a inclusão de teores crescente de PCL na dieta dos animais mostrou-se efetiva na modulação da microbiota fecal e de sua atividade metabólica, com os principais achados de comportamento linear. Dentre os

quais se destaca redução no número de *Clostridium perfringens* e aumento em *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, ácido butírico, acético e AGCC total, bem como dos produtos oriundos do metabolismo fermentativo de compostos nitrogenados (ácido valérico, AGCR total, putrescina, cadaverina, histamina e aminas biogênicas totais) com a inclusão de até 0,6% de PCL na dieta dos animais.

É importante ressaltar que são desconhecidos até o momento os reais efeitos dos produtos da fermentação sobre a saúde dos animais, principalmente AGCR e aminas biogênicas, bem como as concentrações seguras. De forma semelhante, o papel dos AGCC sobre as células intestinais também não estão completamente elucidados, contudo têm sido apontados possíveis efeitos benéficos, como o estímulo a secreção de GLP-2 (*glucagon like-peptide 2*), que atuaria na diferenciação e proliferação celular e na expressão de determinados genes ligados ao transporte de nutrientes no íleo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Dentre os ácidos graxos de cadeia curta com potencial efeito sobre a saúde intestinal destaca-se o ácido butírico. Mentschel e Claus (2003) relatam que este ácido graxo é apontado como responsável por importantes mudanças fisiológicas, tais como capacidade de reverter alterações neoplásicas, efeitos nutritivos exercidos no epitélio do cólon e indução de apoptose em células danificadas. Na avaliação de enema com butirato de sódio, associação do ácido butírico ao sódio, para criança com retocolite ulcerativa inespecífica, Assumpção, Rodrigues e Barbieri (1999) relatam melhora do quadro clínico, laboratorial, endoscópico e histológico com o uso da substância.

De forma similar, ao avaliar modelo de colite de exclusão, Lameiro et al. (2011) observaram redução de lipoperoxidação das células do cólon excluído de trânsito intestinal de ratos submetidos a infusão retal de butirato de sódio, achados associados a melhora histológica, com criptas regulares e ausência de ulcerações epiteliais, o que de acordo com os autores pode estar relacionado ao metabolismo energético, redução na produção de radicais livres e melhora do processo inflamatório.

No entanto, são necessários futuros estudos especificamente delineados para avaliar o papel dos AGCC, bem como dos demais produtos da fermentação, sobre a saúde intestinal da espécie alvo, principalmente em animais saudáveis e acometidos por alterações clínicas, para que sejam possíveis intervenções nutricionais assertivas do ponto de vista da modulação da composição microbiana e de seus

produtos da fermentação, bem como pesquisas com diferentes teores de PCL do presente estudo comparando-os a outras fontes prebióticas.

6 CONCLUSÕES

Pelos resultados dados obtidos na presente pesquisa conclui-se que a PCL apresenta efeito prebiótico quando incluída na dieta de gatos adultos saudáveis, observado a partir da:

- Modulação benéfica da microbiota intestinal, evidenciada pelo aumento em *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* e redução em *Clostridium perfringens*.
- Alteração da atividade metabólica da microbiota, com aumento em ácidos graxos de cadeia curta, em especial do butirato.

REFERÊNCIAS

ADEGBOLA, R. A.; OLD, D. C. Antigenic relationship among type-I fimbriae of Enterobacteriaceae revealed by immune-electronmicroscopy. **Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 21-28, 1987.

APANAVICIUS, C. J.; POWELL, K. L.; VESTER, B. M.; KARR-LILIENTHAL, L. K.; POPE, L. L.; FASTINGER, N. D.; WALLIG, M. A.; TAPPENDEN, K. A.; SWANSON, K. S. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from *Samnonella* challenge in weanling puppies. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1923-1930, 2007.

AQUINO, A. A. Extrato seco de parede de levedura em dieta para gatos adultos. 2009. 171 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

AQUINO, A. A.; SAAD, F. M. O. B.; SANTOS, J. P. F.; ALVES, M. P.; FERRAZZA, R. A.; MIRANDA, M. C. M. G. Efeito do extrato de parede celular de levedura na digestibilidade, no escore fecal e na palatabilidade de dietas para gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 622-630, 2010.

AQUINO, A. A.; ALVES, M. P.; SANTOS, J. P. F.; FELICIANO, M. A. R.; PICCOLI, R. H.; SAAD, F. M. O. B. Efeito do extrato de parede de levedura em dieta seca sobre a microbiologia, ácidos graxos de cadeia curta e redução do odor fecal das fezes de gatos adultos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 479-486, 2012.

AQUINO, A. A.; SAAD, F. M. O. B.; SANTOS, J. P. F.; LEITE, C. A. L.; SAMPAIO, G. R.; FELICIANO, M. A. R. Efeitos da parede de levedura em dieta úmida na microbiota fecal, produção de gás e morfologia intestinal de gatos adultos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1673-1680, 2013.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. (AAFCO). **Official publication 2009**, Washington DC: AAFCO, 2009.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. Washington DC: AOAC, 1995.

ASSUMPÇÃO, I. R.; RODRIGUES, M.; BARBIERI, D. Tratamento de retocolite ulcerativa inespecífica em criança com enemas. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 36, n. 4, p. 238-243, 1999.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 10, p. 341-346, 1995.

BARRY, K. A.; WOJCICKI, B. J.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER, B. M.; SWANSON, K. S.; FAHEY Jr., G. C. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978-2987, 2010.

BARRY, K. A.; WOJCICKI, B. J.; BAUER, L. L.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER BOLER, B. M.; SWANSON, K. S.; FAHEY JR., G. C. Adaptation of healthy adult cats to select dietary fibers in vivo affects gas and short-chain fatty acid production from fiber fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3163-3169, 2011.

BARRY, K. A.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER BOLER, B. M. V.; DOWD, S. E.; SUCHODOLSKI, J. S.; HERISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WHITE, B. A.; FAHEY JR.; SWANSON, K. S. Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 12, p. 5924-5933, 2012.

BELENGUER, A.; DUNCAN, S. H.; CALDER, A. G.; HOLTROP, G.; LOUIS, P.; LOBLEY, G. E.; FLINT, H. J. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3593-3599, 2006.

BELL, E. T.; SUCHODOLSKI, J. S.; ISAIAH, A.; FLEEMAN, L. M.; COOK, A. K.; STEINER, J. M.; MANSFIELD, C. S. Faecal microbiota of cats with insulin-treated diabetes mellitus. **PLOS One**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 2014.

BELOSHAPKA, A. N.; DOWD, S. E.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M.; DUCLOS, L.; SWANSON, K. S. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, n. 3, p. 532-541, 2013.

BERMINGHAM, E. N.; KITTELMANN, S.; YONG, W.; KERR, K. R.; SWANSON, K. S.; ROY, N. C.; THOMAS, D. G. Post-Weaning Diet Affects Faecal Microbial Composition but Not Selected Adipose Gene Expression in the Cat (*Felis catus*). **PLOS One**, v. 8, n. 11, p. 1-13, 2013.

BEYNEN, A. C.; BASS, J. C.; HOEKEMEIJER, P. E.; KAPPERT, H. J.; BAKKER, M. H.; KOOPMAN, J. P.; LEMMENS. Faecal bacterial profile, nitrogen excretion and mineral absorption in healthy dogs fed supplemental oligofructose. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 86, n. 9-10, p. 298-305, 2002.

BOMBA, A.; JONECOVÁ, Z.; KOSCOVA, J.; NEMCOVA, R.; GANCARCIKOVA, S.; MUDRONOVA, D.; SCIRANKOVA, L.; BULECA, V.; LAZAR, G.; POSIVA, J.; KASTEL, R.; MAREKOVA M. The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. **Biologia Bratislava**, v. 61, n. 6, p. 729-734, 2006.

BOURRIAUD, C.; ROBINS, R. J.; MARTIN, L.; KOZLOWSKI, F.; TENAILLEAU, E.; CHERBUT, C.; MICHEL, C. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 201-212, 2005.

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanoligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 458-464, 2009.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 33-41, 1999.

BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 185-189, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Instrução normativa nº13. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 01 de dezembro 2004. Seção 1, p. 61-63.

BROSEY, B. P.; HILL, R. C.; SCOTT, K. C. Gastrointestinal volatile fatty acid concentrations and pH in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 359-361, 2000.

BUDDINGTON, R. K. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 646-651, 2003.

CALABRÒ, S.; CARCIOFI, A. C.; MUSCO, NA.; TUDISCO, R.; GOMES, M. O. S.; CUTRIGNELLI, M. I. Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in vitro gas production technique. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2013.

CANTLE, J. E. **Atomic absorption spectrometry**. New York: Elsevier Scientific, 1982, 448 p.

CARBONERA, N.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P. Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 201-207, 2010.

CARCIOFI, A. C.; OLIVEIRA, L. D.; VASCONCELLOS, R. S. Testes de digestibilidade em cães e gatos. In: CURSO TEÓRICO PRÁTICO SOBRE NUTRIÇÃO DE CÃES E GATOS: UMA VISÃO INDUSTRIAL, 3., 2006. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 50 p.

CARROL, I. M.; CHANG, Y.; PARK, J.; SARTOR, R. B.; RINGEL, Y. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Gut Pathogens**, v. 2, n. 19, p. 1-9, 2010.

CARTER, M. E.; QUINN, P. J. Salmonella infections in cats and dogs. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in domestic animals**. Cambridge: CABI, 2000. p. 231-234.

CAVALCANTI, M. T.; PORTO, T.; PORTO, A. L. F.; BRANDI, I. V.; LIMA FILHO, J. L.; PESSOA JUNIOR, A. Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 151-164, 2004.

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHE, W.; ZHANG, H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. **International Journal Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 215-222, 2008.

CHIZZOTTI, A. F. **Níveis crescentes de mananoproteína sobre a digestibilidade, imunidade e microbiota de cães adultos**. 2012. 88 f. (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M. J. Prebiotics. In: LEE, Y. K.; SALMINEN, S. **Handbook of Prebiotics and Probiotics**. 2th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p.535-581.

de-OLIVEIRA, L. D; CARCIOFI, A. C.; OLIVEIRA, M. C. C.; VASCONCELLOS R. S.; BAZOLLI, R. S.; PEREIRA, G. T.; PRADA, F. Effects of six carbohydrate sources on diet digestibility and postprandial glucose and insulin responses in cats. **Journal of Animal Science**, v.86, n. 9, p. 2237-2246, 2008.

den BESTEN, G.; van EUNEN, K.; GROEN, A. K.; VENEMA, K.; RIJNGOUD, D., BAKKER, B. M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipids Research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. S6-S17. Supplement.

DESAI, A. R.; MUSIL, K. M.; CARR, A. P.; HILL, J. E. Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 120-128, 2009.

DEUSCH, O.; O'FLYNN, C.; COLYER, A.; MORRIS, P.; ALLWAY, D.; JONES, P. G.; SWANSON, K. S. Deep Illumina-Based Shotgun Sequencing Reveals Dietary Effects on the Structure and Function of the Fecal Microbiome of Growing Kittens. **PLOS One**, v. 9, n. 7, p. 1-15, 2014.

DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5810-5817, 2004.

ERWIN, E. S., MARCO, G. J; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FELICIANO, M. A. R.; SAAD, F. M. O. B.; LOGATO, P. V. R.; AQUINO, A. A.; JOSE, V. A.; ROQUE, N. C. Efeitos de probióticos sobre a digestibilidade, escore fecal e características hematológicas em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1268-1274, 2009.

FÉLIX, A. P.; ZANATTA, C. P.; BRITO, C. B. M.; MURAKAMI, F. Y.; FRANÇA, M. I.; MAIORKA, A.; FLEEMING, J. S.; Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 31-35, 2010.

FERNANDES, P. C. C.; LADEIRA, I. Q.; FERREIRA, C. L. L. F.; RODRIGUEZ, N. M.; SILVA, A. V. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 31, p. 53-71, 2000.

FLEET, G. H. Cell Walls. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast organelles**. London: Academic Press, 1991. p. 199-277.

FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom Knows Best: the universality of maternal microbial transmission. **PLOS Biology**, v. 11, n. 8, p. 1-9, 2013.

GAILLARD, E. T.; HARGIS, A. M.; PRIEUR, D. J.; EVERMANN, J. F.; DHILLON, A. S. Pathogenesis of feline gastric chlamydial infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 11, p. 2314-2321, 1984.

GANAN, M.; CARRASCOSA, A. V.; PASCUAL-TERESA, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Inhibition by yeast-derived mannoproteins of adherence to and invasion of CACO-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 55-59, 2009.

GANAN, M.; CARRASCOSA, A. V.; PASCUAL-TERESA, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Effect of mannoproteins on the growth, gastrointestinal viability, and adherence to Caco-2 cells of lactic acid. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 3, p. M176-M180, 2012.

GARCIA, G. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MEDEIROS, A. A.; POIATTI, M. L.; RAGAZZANI, A. V. F.; HATAYDE, M. C.; CHIODA, T. P.; COAN, R. M.; PIGATTO, C. P.; TROVÓ, K. V. P. Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 263-268, 2006.

GARCIA-MAZCORRO, J. F.; MINAMOTO, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 45, n. 2, p. 111-124, 2013.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between

short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **The Journal Agricultural Science**, v. 139, n. 3, p. 341-352, 2002.

GIBSON, G. R., ROBERFROID M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p.1401-12, 1995.

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; TUOHY, K. M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A.; GAREAU, M.; MURPHY, E. F.; SAULNIER, D.; LOH, G.; MACFARLANE, S.; DELZENNE, N.; RINGEL, Y.; KOZIANOWSKI, G.; DICKMANN, R.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; WALKER, C.; BUDDINGTON, R. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2010.

GOMES, M. O. S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2011.

GOUVEIA, E. M. M. F.; SILVA, I. S.; NAKAZATO, G.; ONSELEM, V. J. V.; CORRÊA, R. A. C.; CHANG, M. R. Action of phosphorylated *mannanoligosaccharides* on immune and hematological responses and fecal consistency of dogs experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 499-504, 2013.

GRIESHOP, C.; FLICKINGER, E.; BRUCE, K.; PATIL, A. R.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; FAHEY JR., G. C. Gastrointestinal and Immunological responses of senior dogs to chicory and mannanoligosaccharides. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 6, p. 483-493, 2004.

GRZESKOWIAK, L.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v. 34, p. 14-23, 2015.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.

HANDL, S.; DOWD, S. E.; GARCIA-MAZCORRO, J. F.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 301-310, 2011.

HARGIS, A. M.; PRIEUR, D. J.; GAILLARD, E. T. Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 2, p. 170-178, 1983.

HESTA, M.; JANSSENS, G. P.; DEBRAEKELEER, J.; DE WILDE, R. The effect of oligofructose and inulin on faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 85, p. 135-141, 2001.

HESTA, M.; HOONAERT, E.; VERLINDEN, A.; JANSSENS, P. J. The effect of oligofructose on urea metabolism and faecal odour components in cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, n. 3-6, p. 208-214, 2005.

HEILIG, H. G. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other latic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification aof 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 68, n. 1, p. 114-123, 2002.

HELPS, C.; REEVES, N.; TASKER, S.; HARBOUR, D. Use of real-time quantitative PCR to detect *Chlamydophila felis* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2675-2676, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Informações do domicílio, Visitas domiciliares de Equipe de Saúde da Família e Agentes de Endemias**. São Paulo: IBGE, 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013_vol2/default_xls.sht>. Acesso em: 1 maio 2015.

JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A.; McCARTNEY, A. L. Investigation of the faecal microbiota of kittens: monitoring bacterial succession and effect of diet. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 2, p. 395-404, 2011.

JOHNSTON, K. L.; LAMPORT, A.; BATT, R. M. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. **Veterinary Records**, v. 132, n. 14, p. 362-363, 1993.

KANAKUPT, K.; VESTER BOLER, B. M.; DUNSFORD, B. R.; FAHEY JR., G. C. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite

concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1376-1384, 2011.

KERR, K. R.; DOWD, S. E.; SWANSON, K. S. Salmonellosis impacts the proportions of faecal microbial populations in domestic cats fed 1–3-d-old chicks. **Journal of Nutrition Science**, v. 30, n. e3, p. 1-5, 2014.

KOLLÁR, R.; REINHOLD, B. B.; PETRÁKOVÁ, E.; YEH, H. J.; ASHWELL, G.; DRGONOVÁ, J.; KAPTEYN, J. C.; KLIS, F. M.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall: Beta (1—>6)-glucan interconnects mannoprotein, Beta (1—>3)-glucan and chitin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17762-17775, 1997.

KOOHDAR, V. A.; RAZAVILAR, V.; MOTALEBI, A. A.; MOSAKHANI, F.; VALINASSAB, T. Isolation and Identification of Histamine-forming bacteria in frozen Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, n. 4, p. 678-688, 2011.

LAMIERO, T. M. M.; SILVA, C. M. G.; MARQUES, L. H. S.; CUNHA, F. L.; ALMEIDA, M. G.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R.; Efeitos do butirato nos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica sem trânsito fecal: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 31, n. 2, p. 155,164, 2011.

LEE, M. J. **Prevalence of *Salmonella* sp. in domestic cats in na animal shelter and the comparison of culture and Polymerase Chain Reaction techniques as diagnostic tools**. 2003. 28 f. Thesis (Master of Science) - Texas A&M University, Texas, 2003.

Longbottom, C.; Coulter, L. J. Animal Chlamydiase and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 4, p. 217-244, 2003.

LOUIS, P.; SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p.1197–1208, 2007.

LU, L.; WALKER, A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1124S-1130S, 2001. Supplement.

LUND, M.; NORDENTOFT, S.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5125-5132, 2004.

MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILA, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 269-277, 2003.

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8th. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986 p.

MAUKONEN, J. **Characterization of the human predominant fecal microbiota: With special focus on the *Clostridial* clusters IV and XIVa**. 2012. 161 f. Doctoral Dissertation (Science in Technology) - School of Chemical Technology, Espoo, 2012.

MIDDELBOSS, I. S.; GODOY, M. R.; FASTINGER N. D.; FAHEY-JR, G. C. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 11, p. 3022–3032, 2007.

MIDDELBOSS, I. S.; FASTINGER, N. D.; FAHEY JR., G. C. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 11, p. 3033-3044, 2007.

MINAMOTO, Y.; HOODA, S.; SWANSON, K. S.; SUCHODOLSKI, J. S. Feline gastrointestinal microbiota. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 64-77, 2012.

NAKAE, T.; ELLIOTT, J. A. Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 3, p. 293-299, 1965.

NAM, H. M.; SRINIVASAN, V.; GILLESPIE, B. E.; MURINDA, S. E.; OLIVER, S. P. Application of SYBR Green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environment samples. **International Journal Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 161-171, 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC). **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, D.C: National Academy of Science; National Academy Press, 2006. 398 p.

NEIS, E. P. J. G.; DEJONG, C. H. C.; RENSEN, S. S. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2930-2946, 2015.

NOACK, J.; KLEESSEN, B.; PROLL, J.; DONGOWSKI, G.; BLAUT, M. Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. **Journal of Animal Nutrition**, v. 128, n. 8, p. 1385-1391, 1998.

OSUMI, M. The ultrastruture of yeast cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p. 207-233, 1998.

O'TOOLE, P. W.; COONEY, J. C. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2008, p. 1-9, 2008.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJS, C.; STOBBERINGH, E. E. Quantification of *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 141-147, 2005.

POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. Basic animal nutrition and feeding . 4th ed. New York : John Wiley, 1995, 615p.

PROPST, E. L.; FLINCKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR., G. C. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 12, p. 3057-3066, 2003.

PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of latic acid. **Analist**, v. 94, p.1121-1151, 1969.

RITCHIE, L. E.; BURKE, K. F.; GARCIA-MAZCORRO, J. F.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium spp.* **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 140-146, 2010.

RODRÍGUEZ, J. M.; MURPHY, K.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; KOBER, O. L.; JUGE, N.; AVERSHINA, E.; RUDI, K.; NARBAD, A.; JENMALM, M. C.; MARCHESI, J. R.; COLLADO, M. C. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Healthy & Disease**, v. 26, p. 1-17, 2015.

SAAD, F. M. O. B.; FRANÇA, J. Alimentação natural para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 52-59, 2010. Suplemento Especial.

SEKHON, B. S.; JAIRATH, S. Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 1, n. 2, p. 13-36, 2010.

SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; VILELA, E. S. D.; BALDINI, V. L. S.; BRAGAGNOLO, N. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces sp.*) para Uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1-2, p. 119-125, 1999.

SHABALY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002.

SILVA, R. O. S.; LOBATO, F. C. F. *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. **Anaerobe**, v. 33, p. 14-17, 2015.

SMITH, K. A.; CAMPBELL, C. T.; MURPHY, J.; STOBIEFSKI, M. G.; TENGELSEN, L. A. Compendium of Measures to Control *Chlamydophila psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2010 National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 20, n. 1, p. 32-45, 2011.

SPARKERS, A. H.; PAPASOULIOTIS, K.; SUNVOLD, G.; WERRETT, G.; GRUFFYDD-JONES, E. A.; EGAN, K.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; REINHART, G. Effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides on fecal flora of healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 4, p. 436-440, 1998.

SPRING, P.; WENK, K.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 2, 205-211, 2000.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute Incorporation. **SAS User's guide**: statistics. Cary: SAS, 2002-2008.

STRICKLING, J. A.; HARMON, D. L.; DAWSON, K. A.; GROSS, K. L. Evaluation of oligosaccharide addition to dogs diets: influence on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3-4, p. 205-219, 2000.

SUCHODOLSKI, J. S. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1520-1530, 2011a.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 41, n. 2, p. 261-272, 2011b.

SUNVOLD, G. D.; HUSSEIN, H. S.; FAHEY JR., G. C.; MERCHEN, N. R.; REINHART, G. A. *In Vitro* Fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 12, p. 3639-3648, 1995a.

SUNVOLD, G. D.; FAHEY JR., G. C.; MERCHEN, N. R.; REINHART, G. A. *In vitro* fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 1110-1122, 1995b.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR., G. C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrients digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 980-989, 2002.

SWANSON, K. S.; DOWD, S. E.; SUCHODOLSKI, J. S.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER, B. M.; BARRY, K. A.; NELSON, K. E.; TORRALBA, M.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; CANN, K.; WHITE, B. A.; FAHEY JR., G. C. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. **International Society for Microbial Ecology**, v. 5, n. 4, p. 639-649, 2011.

TERWEE, J.; SABARA, M.; KOKJOHN, K.; SANDBULTE, J.; FRENCHICK, P.; DREIER, K. J. Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 259-281, 1998.

THUM, C.; COOKSON, A. L.; OTTER, D. E.; MCNABB, W. C.; HODGKINSON, A. L.; DUER, J.; ROY, N. C. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? **Journal of Nutrition**, 142, n. 11, p. 1921-1928, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology an Introduction**. 7th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2001. 887p.

TUN, H. M.; BRAR, M. S.; KHIN, N.; JUN, L.; HUI, R. K.; DOWD, S. E.; LEUNG, F. C. Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 3, p. 369-376, 2012.

TUOMOLA, E. M.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 137-142, 1999.

VALE, S. R.; GLORIA, M. B. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 5, p.1006-1012, 1997.

VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; BUCK, J.; RYCHLIK, I.; HRADECKA, H.; COLLARD, J-M.; WILDEMAUWE, C.; HEYNDRIKX, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK. Cats as a risk for transmission of antimicrobial drug-resistant *Salmonella*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2169-2174, 2004.

VERBRUGGHE, A.; JANSSENS, G. P.; MEININGER, E.; DAMINET, S.; PIRON, K.; VANHAECKE, L.; WUYTS, B.; BUYSE, J.; HESTA, M. Intestinal fermentation modulates postprandial acylcarnitine profile and nitrogen metabolism in a true carnivore: the domestic cat (*Felis catus*). **British Journal Nutrition**, v. 104, p. 972–979, 2010.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W. Detection of *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2578-2585, 2001.

WANG, R.; CAO, W.; FRANKLIN, W.; CAMPBELL, W.; CERNIGLIA, C. E. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 2, p. 131-138, 1994.

WILLARD, M. D.; SIMPSON, R. B.; COHEN, N. D.; CLANCY, J. S. Effects of dietary fructooligosaccharide on selected bacterial populations in feces of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 7, p. 820-825, 2000.

ZENTEK, J.; MARQUAT, B.; PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1682S-1684S, 2002. Supplement.