MARIANA FRAGOSO RENTAS

Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães

Pirassununga

2018

MARIANA FRAGOSO RENTAS

Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

De acordo:

Orientador

Pirassununga
2018

Obs.: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

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. 3685
FMVZ

Rentas, Mariana Fragoso
Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães / Mariana Fragoso Rentas. – 2018.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2018.

1. AGCC. 2. *Blend*. 3. GOS. 4. Imunidade. 5. Prebiótico. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães**" protocolada sob o CEUA nº 5359160216, sob a responsabilidade de **Marcio Antonio Brunetto e equipe; Mariana Fragoso Rentas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2018.

We certify that the proposal "**Effects of the addition of different intestinal health promoters on digestibility, fermentative products and immunological parameters in dogs**", utilizing 24 Dogs (males and females), protocol number CEUA 5359160216, under the responsibility of **Marcio Antonio Brunetto and team; Mariana Fragoso Rentas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **09/2018**
animal

Área: **Nutrição e produção**

Origem: **Premier Pet**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 anos**

N: **24**

Linhagem: **varias raças**

Peso: **15,0kg**

Resumo: A indústria de pet food cresce juntamente com as pesquisas nessa área com os objetivos não apenas de atender as necessidades nutricionais, mas também, com o propósito de promover saúde, bem estar e longevidade aos animais de companhia. A nutrição canina, assim como a humana, está em ampla evolução tecnológica. Os pesquisadores na área, assim como os formuladores, buscam ingredientes funcionais que ofereçam benefícios além da nutrição básica. Dentre os ingredientes funcionais mais utilizados pela indústria destacam-se os prebióticos, os quais podem produzir benefícios ao hospedeiro. Devido às recentes descobertas em relação a modulação microbiana e suas funções sobre a saúde intestinal, somado a falta de informação na literatura, são necessários novos estudos para elucidar o papel desses compostos sobre a microbiota fecal e imunidade de cães e gatos. O objetivo desse estudo é avaliar os efeitos de suplementos promotores de saúde intestinal na digestibilidade dos nutrientes, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães adultos. Para tal, serão utilizados 24 cães adultos divididos em seis blocos e, distribuídos aleatoriamente nos tratamentos (1,0% de GOS; 0,5% de um "blend de prebióticos"; 1,0% de um "blend de prebióticos" e controle), seguindo um delineamento em blocos casualizados. O experimento será constituído de 30 dias, sendo os 20 primeiros de adaptação aos tratamentos e os últimos 10 dias de coletas de fezes e sangue. Os resultados obtidos serão analisados quanto a sua normalidade e as médias serão comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Local do experimento: Centro de Desenvolvimento
Nutricional, Premier Pet

São Paulo, 15 de março de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Rentas, Mariana Fragoso

Título: **Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho,

Aos meus pais, Robson Galeote Rentas e Miriam de Lourdes Chiari Fragoso Rentas, e ao meu irmão Marco Aurélio Fragoso Rentas que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, me incentivando a nunca desistir do meu sonho.

Aos meus avós Nelson Rentas Iglesias (in memoriam), Shirley Rosa Galeote Rentas, René Ourique Fragoso e Edna Zenaidir Chiari Fragoso, por todo carinho e ensinamentos de vida.

Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

- A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, que vem sendo a minha segunda durante todos os anos de graduação e agora no mestrado, tenho orgulho de pertencer a essa escola.
- Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, pela oportunidade e acolhimento.
- A empresa Premier Pet não somente pelo financiamento da pesquisa, mas também por todo apoio, cuidado e carinho durante o experimento. A toda equipe: Cristiana, Raquel, Paula, Juliana, Josye, Claudemir, Lucas, Brown, Joyce, Leda, Juliana, Susana, Emily e Suellen.
- A empresa Yes pelo financiamento da pesquisa, principalmente ao representante André Buck, pelo apoio, e atenção durante todo o processo do experimento.
- Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por meio da Prof. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera e suas orientadas Camila e Kamila, por contribuírem com o trabalho.
- Ao CNPQ pela bolsa concedida
- À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Julio Balieiro e do secretário João Paulo de Oliveira Barros, pela pronta atenção dispensada.
- À todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal, em especial ao João Paulo de Oliveira Barros, Alessandra de Cassia Terassi da Silva, Fábila Silene Iaderezza, Renata Maria Consentino Conti, Simi Luiza Durante Aflalo, Lucinéia Mestieri e Josane Leão Ferraz.
- Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pela positiva participação na minha formação, desde a graduação em Medicina Veterinária.

- Ao Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto, pela orientação e ensinamentos tanto para minha formação acadêmica como pessoal, pela confiança, amizade, paciência, disponibilidade e oportunidade.
- A toda equipe de funcionários, colaboradores e animais do CEPEN PET por fazerem meus dias mais felizes, amo vocês.
- A Deus, por me dar saúde e força para conseguir realizar esse trabalho.
- Aos meus pais, Robson e Miriam por toda a dedicação, esforço e amor para que eu pudesse realizar mais esse sonho.
- Ao meu irmão, Marco Aurélio pela companhia, carinho, risadas, brigas e crescimento, sem você eu não seria a mesma.
- Aos meus avós Shirley, Nelson (in memoriam), Edna e René por serem essas pessoas tão maravilhosas.
- Aos meus padrinhos Isabel e Renato, e a todos os meus tios, tias e primos por sempre torcerem por mim e me ajudar quando preciso.
- Aos meus melhores amigos, Renan Zala, Talita Alves, e Filipe Zanferari, e afilhada Pietra que estão sempre presentes mesmo distantes, enchendo meu coração de alegria.
- Ao meu namorado, Caio Ueda Arata (Vel) por cuidar de mim nesses momentos em que nem eu mesma achava que conseguiria.
- A Nozes, minha segunda família. Vocês tornam meus dias mais sorridentes, obrigada por tudo, vocês são demais: Lari, Robs, Dressete, Perini, Tobs, Rafa e Cati.
- Aos amigos que fiz durante minha jornada, pelas risadas, festas, choros e experiências compartilhadas, amo vocês: Laís Helena, Monica Quintal, Natasha Crippa, Paula Rodrigues, Izabelle Jardim, Marisa França, Gabriela Pombo, Fernanda Ramos, Thaís Longo e Andressa Guterres.
- A todos os colegas de pós graduação, em especial aos grandes amigos que levarei para sempre em meu coração: Hortencia Mazzo, Maurício Machado, Patrícia Massae Oba, Rafael Nascimento e Camila Biancone.
- A todos os estagiários, ICs e alunos de praticas que tive a oportunidade de trocar experiências. Em especial para: Pri, Matheus, Ana e Paula.

- Aos meus grandes amigos das republicas do meu coração (Tatu currido e Nostravamos) por todas as covensar, risadas e churrascos, em especial para Nicolas, André e Caio.
- Aos meus "filhos" de quatro patas, Timão (in memoriam), Pink (in memoriam), Lise (in memoriam), Keeper, Muffin, Petit Gateau, Cappuccino, Paçoca, Shiro, Juju, Átila e Perola, por serem tão companheiros e amorosos. Foram inspiração para que seguisse essa profissão linda.
- A todos os cães que participaram do experimento: Lloyd, Yoko, Aila, Swat, Samba, Yuki, Nala, Theo, Bella, Olívia, Akiles, Yuri, Ethel, Timão, Apolo, Thor, Mel, Lucy, Lua, Marley, Aladin, Malala, Areta e Blue, por serem tão compreensivos e carinhosos.

Meus sinceros agradecimentos.

"Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que acham que sabem alguma coisa"

Sócrates

*"Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem...
Quem acredita sempre alcança"*

Renato Russo

RESUMO

RENTAS, M.R. **Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães.** [Effects of the addition of different intestinal health promoters on digestibility, microbial modulation, fermentative products and immunological parameters in dogs.]. 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A indústria de pet food cresce juntamente com as pesquisas nessa área com os objetivos não apenas de atender as necessidades nutricionais, mas também, com o propósito de promover saúde, bem estar e longevidade aos animais de companhia. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos de suplementos promotores de saúde intestinal sobre a digestibilidade dos nutrientes, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães adultos. Foram utilizados 24 cães adultos de diferentes pesos e portes, divididos em seis blocos casualizados e, distribuídos aleatoriamente nos tratamentos [(CO) controle, sem adição de prebiótico; (GOS) inclusão de 1,0% de galactooligosacarídeos; (B1) inclusão de 0,5% de um “blend de prebióticos”; (B2) inclusão de 1,0% de um “blend de prebióticos”]. O experimento foi constituído de 30 dias, sendo os 20 primeiros de adaptação aos tratamentos e os últimos 10 dias de coletas de fezes e sangue. Os dados obtidos foram analisados no programa SAS. Foram previamente verificadas normalidade dos resíduos e homogeneidade das variancias, em seguida os dados foram submetidos a teste de ANOVA, por fim as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A suplementação dos prebióticos não alterou os coeficientes de digestibilidade aparente testados, produção e escore fecal ($p>0,05$). Em relação aos produtos de fermentação avaliados, a adição dos promotores de saúde intestinal não alterou o pH fecal, nem as concentrações de amônia, ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) totais, ácido valérico, ácido iso-butírico e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) totais das fezes ($p>0,05$). No entanto, a adição de GOS diminuiu a concentração do AGCR iso-valérico ($p=0,0423$) em relação a B1. Quanto aos parâmetros imunológicos avaliados, a adição de GOS e B2 aumentou o número total de células polimorfonucleares, assim como o *burst* oxidativo em relação aos tratamentos B1 e

CO ($p < 0,0001$). O tratamento B2 melhorou o índice de fagocitose de *S. aureus* em relação ao CO, porém não diferiu dos demais ($p = 0,011$). No teste de fagocitose de *E. coli*, os tratamentos GOS e B2 apresentaram melhor índice do que o tratamento CO, o qual não diferiu de B1 ($p = 0,0067$). Pode-se concluir que os tratamentos GOS e *Blend* Yes Golf, quando incluídos a 1,0% na formulação do alimento, aumentaram a atividade fagocitária e o *burst* oxidativo de cães saudáveis.

Palavras-chave: AGCC. *Blend*. GOS. Imunidade. Prebiótico.

.

ABSTRACT

RENTAS, M.R. **Effects of the addition of different intestinal health promoters on digestibility, fermentative products and immunological parameters in dogs.** [Efeitos da adição de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade, produtos fermentativos e parâmetros imunológicos em cães.]. 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The pet food industry grows along with research in this area with the goals not only of meeting nutritional needs but also with the purpose of promoting health, well-being and longevity to companion animals. The objective of this study was to evaluate the effects of intestinal health promoting supplements on nutrient digestibility, fermentative products and immunological parameters in adult dogs. Twenty-four adult dogs were divided into six blocks and randomly assigned to the treatments [a control treatments, without prebiotics (CO); inclusion of 0.5% a prebiotic blend Yes Golf (B1); inclusion of 1.0.% galactooligosaccharide (GOS); inclusion of 1.0% a prebiotic blend Yes Golf (B2)], following a randomized block design. The experiment consisted of 30 days, being the first 20 of adaptation to the treatments and the last 10 days of collections of feces and blood. The results were analyzed for their normality and the means were compared by the Tukey test at the significance level of 5.0%. Prebiotic supplementation had no effect on the apparent digestibility coefficients tested, yield and fecal score ($p > 0.05$). For the fermentation products evaluated, the addition of the intestinal health promoters did not alter the fecal pH, nor the concentrations of ammonia, lactic acid, short chain fatty acids (SCFA) and most faecal branched chain fatty acids (BCFA) ($p > 0.05$). The addition of GOS decreased the concentration of iso-valeric fatty acid ($p = 0.0423$). Regarding the immunological parameters evaluated, the addition of GOS and B2 increased the total number of polymorphonuclear cells, as well as the oxidative burst in relation to the treatments B1 and CO ($p < 0.0001$). Treatment B2 improved the rate of *S. aureus* phagocytosis in relation to CO, but did not differ from the others, and treatments B1 and GOS did not differ from CO ($p = 0.0111$). For *E.coli* phagocytosis, the GOS and B2 treatments had a better index than the CO treatment, which did not differ from B1 ($p = 0.0067$). It can be concluded that GOS and B2, when included 1.0% in the formulation of the food, seem to present prebiotic potential regarding the immunity of healthy dogs.

Keywords: SCFA. Blend. GOS. Imunity. Prebiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β -galactosidase	38
Figura 2. Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais.....	48
Figura 3 Identificação das populações de leucócitos e polimorfonucleares no sangue dos cães.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção de ingredientes dos alimentos experimentais	46
Tabela 2 Composição química analisada dos alimentos experimentais	47
Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e escore fecal de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes promotores de saúde intestinal	54
Tabela 4 Concentração de ácido láctico, amônia, pH fecal, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada nas fezes de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes promotores de saúde intestinal	55
Tabela 5 Resultados dos testes de fagocitose e burst oxidativo de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes promotores de saúde intestinal.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resultados de pesquisas com o uso de prebióticos na digestibilidade dos nutrientes, microbiota e produtos da fermentação de cães e gatos	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGCR	Ácido graxo de cadeia ramificada
B1	Blend prebiótico Yes Golf, com inclusão de 0,5% no alimento
B2	Blend prebiótico Yes Golf, com inclusão de 1,0% no alimento
CDA	Coeficiente de digestibilidade aparente
CO	Controle
COV	Compostos orgânicos voláteis
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
EEHA	Extrato etéreo em hidrólise ácida
ENN	Extrativos não nitrogenados
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FB	Fibra bruta
FOS	Frutooligossacarídeo
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GOS	Galactooligossacarídeo
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LMA	Levedura com metabólitos ativos
MM	Matéria mineral
MOS	Mananooligossacarídeo
MS	Matéria seca
PB	Proteína bruta
PBS	Tampão fosfato salina
PCL	Parede celular de levedura
SUG	Sequenciamento de última geração
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta

TGI	Trato gastrointestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1.	Microbiota intestinal	24
2.2.	Produtos fermentativos e saúde intestinal	27
2.3.	Trato gastrointestinal e imunidade	29
2.4.	Prebióticos na alimentação de cães e gatos.....	32
2.5.	GOS.....	37
2.6.	BLENDS prebióticos	40
2.6.1.	MOS	40
2.6.2.	FOS	42
2.6.3.	β-GLUCANOS.....	43
3.	OBJETIVOS.....	44
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.2.	Local, instalações e animais	44
4.3.	Dietas e delineamento experimental	45
4.4.	Digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal	48
4.5.	Determinação do pH fecal.....	49
4.6.	Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes	50
4.7.	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia ramificada.....	50
4.8.	Determinação da concentração de ácido lático nas fezes	51
4.9.	Avaliação imunológica das amostras de sangue	52
4.10.	Análise estatística	53
5.	RESULTADOS	54
5.2.	Digestibilidade aparente dos nutrientes e variáveis fecais	54
5.3.	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada, nitrogênio amoniacal e ácido lático...55	
5.4.	Avaliação de imunidade	56
6.	DISCUSSÃO	58
6.2.	Digestibilidade aparente dos nutrientes e variáveis fecais	58
6.3.	Ácidos graxos de cadeia curta, ramificada, nitrogênio amoniacal e ácido lático	59
6.4.	Imunidade	61
7.	CONCLUSÕES.....	64

8.	REFERÊNCIAS.....	65
----	------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Segundo o IBGE (2013), a população de cães domiciliados no Brasil foi estimada em 52,2 milhões, alocados em 28,9 milhões de lares, o que resulta em uma média de 1,8 cães por domicílio. Uma mudança nítida ocorrida nos últimos anos foi a percepção dos tutores em relação a este animal de companhia. A maioria das pessoas que possuem um cão considera esse animal como membro da família. Segundo a CVA PetCare (2016) - 31,0% da população avaliada considera os cães como um membro da família e, 29,0% considera-os como filhos. Essa preocupação dos tutores com seus pets mudou a visão e ampliou o mercado pet como um todo e, isso não foi diferente para o segmento de alimentos.

Atualmente já é sabido que o objetivo da nutrição de cães não está apenas ligado à saciedade e sobrevivência, mas também no bem estar, melhora da saúde e redução do risco de doenças (CERBO et al., 2017). A nutrição canina, assim como a humana, está em ampla evolução tecnológica. Os pesquisadores da área, assim como os formuladores, buscam ingredientes funcionais que ofereçam benefícios além da nutrição básica (MIDDELBOS et al., 2007;). Dentre as pesquisas mais promissoras dentro da nutrologia/nutrição pet, estão os alimentos que atuam no metabolismo de macronutrientes, possuem efeitos antioxidantes e que promovem benefícios à saúde do trato gastrointestinal (CERBO et al., 2017).

Nas últimas décadas, os alimentos funcionais comerciais foram introduzidos no mercado com o intuito de suprir a demanda relacionada à preocupação com a melhora de vida e longevidade dos pets (SANTOS, 2015). Já que possuem componentes fisiologicamente ativos inclusos, os quais geram benefícios adicionais à nutrição convencional, como a possibilidade de redução dos riscos de doenças ou promoção da saúde (ROBERFROID et al., 2010). Estes componentes podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (PELÍCIA et al., 2004; ROBERFROID et al., 2010).

Dentre os ingredientes funcionais mais utilizados pela indústria, destacam-se os prebióticos, que são definidos como ingredientes nutricionais não digeríveis, os

quais produzem benefícios ao hospedeiro por estimularem de forma seletiva o crescimento e a atividade de um grupo ou mais de bactérias intestinais benéficas (ROBERFROID et al., 2010). Os prébióticos podem estar presentes nos ingredientes das dietas ou serem adicionados através de fontes exógenas concentradas (PELICIA et al., 2004; ROBERFROID et al., 2010). Apesar de existirem vários compostos que, além de resistentes à digestão de cães, são potencialmente fermentáveis, nem todos agem como estimuladores no desenvolvimento dos microrganismos benéficos no trato gastrointestinal.

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro (OZGUN et al., 2017), através do estímulo ao crescimento e/ou pela ativação do metabolismo de grupos bacterianos do trato intestinal. As bactérias consideradas benéficas podem agir de diversas formas sobre a microbiota patogênica e, resultar em melhor status de saúde intestinal (ROBERFROID et al., 2010).

Além de promoverem melhora da saúde intestinal, os prebióticos podem acarretar mudanças benéficas também para o sistema imune do animal. Eles atuam indiretamente de forma benéfica sobre o sistema imune do hospedeiro ao estimularem o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico. Estas populações bacterianas produzem substâncias com propriedades imunoestimulatórias. Tais substâncias interagem com o sistema imune, promovendo a produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrofágica e indução de síntese de maiores quantidades de imunoglobulinas (ALVARENGA, 2016).

Os galactooligossacarídeos (GOS) são prebióticos de alto valor agregado, sintetizados a partir da transgalactosilação da lactose. Estudos recentes atribuem a estes oligossacarídeos uma série de potenciais benefícios à saúde (FAI & PASTORE, 2015). Seus efeitos positivos ao animal ocorrem principalmente devido ao aumento da população de Bifidobactérias no cólon e por efeito antagônico, supressão da atividade de bactérias putrefativas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos (NERI et al., 2009; MONTILLA et al., 2015).

Algumas empresas atuantes no mercado de alimentos para animais investem em blends prebióticos, os quais são compostos por mais de um ingrediente funcional. Esses blends normalmente são incorporados na dieta dos animais com intuito de modular a microbiota, por consequência melhorar a saúde intestinal e imunidade dos mesmos.

Devido a importância da saúde do intestino e a necessidade de mais informações a respeito do uso dos promotores de saúde intestinal, este estudo objetivou explorar novas possibilidades para este fim.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) é um ecossistema complexo composto por espécies de bactérias, fungos, protozoários e vírus. Ela pode ser definida como o agregado de todos os microrganismos que habitam o intestino e o sistema de interações que esses organismos apresentam entre si e, com as células hospedeiras (BLAKE & SUCHODOLSKI, 2016). Das espécies de bactérias presentes na microbiota, algumas apresentam potencial patogênico, enquanto outras são consideradas benéficas para o hospedeiro (ROBERFROID et al., 2010).

Tal ecossistema complexo e diverso pode contribuir de maneira benéfica à saúde do hospedeiro (HEIJTZ, 2016). Quando está em eubiose colabora para o bom funcionamento dos processos de digestão, metabolização de nutrientes, desenvolvimento, imunológicos e fisiológicos (HOOPER et al., 2001; OUWEHAND et al., 2005). Além disso, esses microrganismos podem contribuir com a manutenção da saúde local, devido à participação da microbiota intestinal em muitos processos importantes para o metabolismo do hospedeiro, como metabolismo dos ácidos biliares, fermentação e utilização dos produtos de carboidratos não digeríveis e proteínas (DENG & SWANSON, 2015). Estudos recentes realizados em animais criados em ambiente estéril demonstraram papel importante da microbiota comensal em recuperar energia e produção de vitaminas. Roedores germ-free quando comparados com roedores convencionais, requereram 30% mais energia em sua dieta e, a suplementação com vitamina K e várias vitaminas do complexo B foram necessárias para auxiliar o crescimento e o desenvolvimento desses animais (TAPPENDEN et al., 2014).

Acreditava-se que a colonização do TGI pelos microrganismos ocorria durante o parto, porém uma pesquisa recente demonstrou que ela pode iniciar na fase fetal (HEIJTZ, 2016). Logo, a presença de bactérias no útero pode ser considerada fator

prejudicial ao feto (RODRÍGUEZ et al., 2015; SANTOS, 2015; HEIJTZ, 2016), e influenciar no desenvolvimento imunológico do indivíduo, já que podem competir pelos mesmos sítios de ligação da microbiota nativa do TGI (THUM et al., 2012; FUNKHOUSER & BORDENSTEIN, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015; SANTOS, 2015). A microbiota intestinal se estabelece ao longo do tempo, conforme as experiências alimentares, exposição a microrganismos e a exploração do ambiente pelo indivíduo. Além disso, podem ocorrer mudanças em sua composição, dependendo dos desafios, idade e desordens digestivas que podem ocorrer (PAIXAO & CASTRO, 2016). Além disso, o perfil da microbiota residente pode ser influenciado pela utilização de ingredientes alimentares como fontes de fibras, prebióticos, enzimas, probióticos e agentes acidificantes (WENK, 2006).

A utilização de prebióticos na alimentação de cães tem o intuito de modular a microbiota. Esses componentes dietéticos estimulam a fermentação e, causam por consequência, aumento da massa bacteriana. Estima-se que cerca de 30g de bactérias são produzidas para cada 100g de carboidrato fermentado, em humanos (SLAVIN, 2013). Esses oligossacarídeos são fermentados por grupos bacterianos que possuem metabolismo sacarolítico quase que exclusivo, os quais são considerados potencialmente benéficos. Tal perfil metabólico é típico de lactobacilos e bifidobactérias (SLAVIN, 2013). Os produtos de fermentação criam ambiente favorável para proliferação desses grupos bacterianos e, desfavorável para outros com potencial patogênico (CAPPELLI et al., 2016).

Existem poucas informações na literatura sobre o microbioma de cães e gatos, sendo que, a maioria das pesquisas realizou a análise fecal de animais saudáveis (DENG & SWANSON, 2014). Simpson et al. (2002) ao caracterizarem a composição bacteriana de fezes de cães, observaram concentração 20 vezes menor no número de aeróbios (2×10^9 UFC - Unidades Formadoras de Colônias) em relação a anaeróbios totais (4×10^{10} UFC). Quando avaliaram o grupo de anaeróbios, observou-se maior número de bacteroidetes em cães jovens (2,5 anos) comparado a cães mais velhos (10,9 anos). Concentrações de lactobacillus e bifidobacteria não tiveram influência de idade. Os mesmos autores observaram também influência da raça dos animais na composição da microbiota. Cães da raça Pastor Alemão

tenderam a apresentar maior número de *Clostridium* e os da raça Setter Inglês maior número de *Fusobacteria*.

Middelbos et al. (2010) em outro experimento realizado com cães saudáveis, encontraram frequência de 40% do filo *Fusobacteria*, 35% do filo *Bacteroidetes* e apenas 25% do filo *Firmicutes*. Resultados diferentes foram obtidos por Handlet et al. (2011), os quais observaram predominância de 92% de bactérias do filo *Firmicutes* e abundância de 2,3% do filo *Bacteroidetes*. Neste mesmo estudo, o gênero *Nakaseomyces* foi predominante dentre a microbiota fúngica. Durante a avaliação dos segmentos do trato gastrointestinal de cães, Honneffer et al. (2017) encontraram a prevalência geral de bactérias do filo *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Santos (2017) avaliou o efeito de diferentes níveis de inclusão de levedura com metabólitos ativos (LMA) na microbiota de cães saudáveis. Neste estudo a adição da LMA, aumentou a concentração dos filotaxas *Actinobacteria* e *Firmicutes* em porcentagem das sequências totais, enquanto o filo *Fusobacteria* foi reduzido. Independente do nível de inclusão, a adição da levedura promoveu redução dos gêneros *Allobaculum* e *Fusobacterium* e aumento do gênero *Clostridium*. No maior nível de inclusão do prebiótico (LMA 0,6), a autora observou aumento do gênero *Collinsella* e redução de *Provetella*.

Vários fatores podem interferir nos resultados das proporções na microbiota fecal, dentre eles, os intrínsecos como espécie, indivíduo, dieta e ambiente. Além dos externos 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). O ambiente do trato gastrointestinal de mamíferos é complexo e necessita de caracterização mais aprofundada. Técnicas mais antigas, como a de cultivo, são comumente usadas, porém são incapazes de cultivar e classificar cerca de 99,0% das bactérias presentes no intestino (GREETHAM et al., 2002; GERMAN et al., 2003; TAP et al., 2009). Desta forma, ferramentas moleculares se tornaram um método padrão para investigar a microbiota intestinal de cães e gatos (SUCHODOLSKI, 2011).

As técnicas moleculares por outro lado, são capazes de identificar o microrganismo de forma eficaz através de substâncias específicas presentes na

célula bacteriana, tais como RNA e DNA (ZUCKERKANDL & PAULING, 1965). O PCR foi bastante utilizado para caracterizar a microbiota do TGI. No entanto, com essa técnica é possível identificar espécies bacterianas específicas, as quais representam apenas uma pequena fração da microbiota total. Portanto, não são percebidas alterações em espécies bacterianas diferentes das quantificadas (MIDDELBOSS et al., 2007). O sequenciamento de última geração (SUG) é uma técnica baseada em DNA, que permite avaliação abrangente da comunidade microbiana gastrointestinal, a qual proporciona amplo escopo do microbioma, o que seria impossível pelos métodos tradicionais. O SUG e a disponibilidade de ferramentas de bioinformática podem gerar a classificação detalhada do rRNA 16S da microbiota intestinal (DEUSCH et al., 2014).

2.2. PRODUTOS FERMENTATIVOS E SAÚDE INTESTINAL

O processo de digestão e absorção do sistema gastrointestinal é muito eficiente, porém quantidades consideráveis de compostos nitrogenados podem não ser absorvidos pelo epitélio do intestino delgado e, portanto, permanecem no lúmen (BLACHIER et al., 2007; BOYE et al., 2012). Esses por sua vez, são transportados para o intestino grosso, onde passam por proteólise pelas bactérias residentes no local. Tal processo resulta na liberação de peptídeos e aminoácidos que sofrem uma série de reações de oxidação e redução. Como produtos finais, são originados diversos compostos de putrefação, tais como amônia, aminas, ácidos graxos de cadeia ramificada, indóis, fenóis e compostos sulfurados. Estes compostos orgânicos voláteis (COVs) são responsáveis pelo mal odor nas fezes dos cães e podem indicar alteração do estado de saúde gastrointestinal do animal (HUSSEIN & SUNVOLD, 2000; ROUDEBUSH et al., 2010).

Por outro lado, a presença de bactérias no cólon, cerca de 10^{10} por grama de fezes na matéria seca, apresenta importante participação na fermentação de carboidratos complexos como amido resistente, polissacarídeos não amilíferos, oligossacarídeos não digeríveis e álcoois de açúcar. A principal via de fermentação gera piruvato a partir de hexoses do carboidrato não digerido. As bactérias do cólon usam uma gama de enzimas hidrolisantes de carboidratos para produzir hidrogênio,

metano, dióxido de carbono, AGCC (principalmente acetato, propionato e butirato) e lactato (SLAVIN, 2013). Esses produtos da fermentação, em especial os AGCC, desempenham papel importante na manutenção da saúde do TGI. As células epiteliais do cólon preferencialmente utilizam o butirato como fonte de energia, mesmo quando substratos concorrentes, como glicose e glutamina, estão disponíveis (SLAVIN, 2013). O butirato é considerado um nutriente-chave que determina a atividade metabólica e o crescimento dos colonócitos e pode funcionar como um fator de proteção primário contra os distúrbios colônicos (LUPTON, 2004; NRC, 2006).

Os AGCC são solúveis em água e absorvidos pela corrente sanguínea, sendo fonte extra de energia. O cérebro, os músculos e os tecidos metabolizam o acetato de forma sistêmica, enquanto o propionato é depurado pelo fígado e pode diminuir a produção hepática de colesterol, interferindo na sua síntese (SLAVIN, 2013). Estima-se que em humanos o transporte e o metabolismo adicional de AGCC no fígado, músculo ou outros tecidos periféricos contribuam com cerca de 7,0% a 8,0% das necessidades energéticas diárias do hospedeiro (CUMMINGS & MACFARLANE, 1991). Os produtos intermediários da fermentação como o ácido láctico, succínico, pirúvico e o etanol são usualmente metabolizados a AGCC. Ácidos orgânicos de maneira geral têm atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias Gram negativas como *E. coli* e espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* (ADAM, 2003).

Além disso, a fermentação aumenta a produção de ácido láctico, a qual reduz o pH luminal e fecal, que inibe o crescimento de microrganismos patogênicos. O baixo pH fecal resulta em redução da degradação de peptídeos e na formação de compostos tóxicos, como amônia, aminas e compostos fenólicos e, diminui a atividade de enzimas bacterianas indesejáveis (CARBONERA & ESPIRITO SANTO, 2010; SLAVIN, 2013). Porém, a redução do pH não afetou a proliferação de bactérias benéficas como *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* (SLAVIN, 2013).

Várias vias metabólicas estão presentes na formação dos AGCC. De forma sucinta, a síntese de ácido acético ocorre através da hidrólise do acetil-CoA, formado a partir do piruvato, que produz CO₂, o qual é convertido com grupo metil e CoA à acetil-CoA. Entretanto, a maior parte do piruvato é convertido em acetil-CoA. Já na 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. Na formação do 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; BESTEN et al., 2013; SANTOS, 2015).

2.3. TRATO GASTROINTESTINAL E IMUNIDADE

A evolução dos vertebrados coincidiu com o surgimento do sistema imune adaptativo, cujos principais componentes são os linfócitos T e B. A aquisição de mecanismos recombinatórios genéticos, geram receptores de reconhecimento de antígenos diversos e antecipatórios em células T e B. Isso permitiu respostas específicas a uma vasta diversidade de antígenos e memória imunológica de vida longa. Sendo assim, o sistema imunológico é responsável por reconhecer, responder e se adaptar a inúmeras moléculas estranhas e, portanto, é importante durante as condições de saúde e doença (ROUND & MAZMANIAN, 2009). Acreditava-se que o sistema imunológico evoluiu para se proteger da infecção por patógenos microbianos. No entanto, é sabido que os animais coexistem de forma pacífica com uma microbiota vasta e complexa, que interage de diferentes formas com o sistema imunológico. Essas interações moleculares parecem direcionar o desenvolvimento de respostas imunes e, por sua vez, o sistema imunológico molda a composição da microbiota (MAYNARD et al., 2012).

O trato gastrointestinal é o principal local de interação entre o sistema imune e os microrganismos. O *gut associated lymphoid tissue* (GALT) localizado no intestino é o maior órgão imunológico do organismo, pois apresenta cerca de 80,0% das células de defesa do corpo e mais de 50,0% das células imunes efectoras

(SWANSON & FAHEY, 2007). O GALT é constituído por estruturas linfoides organizadas, como as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e a lâmina própria intestinal (STOKES & WALY, 2006). Nestas estruturas encontram-se tipos celulares específicos, como linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos (GERMAN et al., 1999). O GALT realiza atividades importantes como captura, processamento e apresentação dos antígenos ingeridos; produção de anticorpos locais, em especial IgA; ativação de respostas imunes citomediadas, particularmente as mediadas por linfócitos T CD8+ (células citotóxicas) e macrófagos.

A alteração da microbiota intestinal consequente ao uso de prebióticos pode ocorrer, basicamente, de duas maneiras: pelo fornecimento de nutrientes para as bactérias desejáveis e por exclusão competitiva. Assim, por estes dois mecanismos a colonização intestinal indesejável é reduzida, o que resulta em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal. Para que as bactérias indesejáveis consigam colonizar o trato intestinal e criar condição de doença precisam aderir-se à superfície epitelial dos enterócitos. Esta adesão ocorre através das fímbrias bacterianas, que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, se as bactérias se ligarem a um açúcar ou oligossacarídeo dietético e, não à mucosa intestinal, irão passar com a digesta sem causar transtornos para os animais (SILVA, 2006).

Prebióticos podem exercer efeitos sobre a barreira intestinal e sistema imune, por ação dos AGCC produzidos pela microbiota. Um deles, o butirato, foi identificado como modulador da acetilação da cauda das histonas e, consequentemente, pode aumentar a acessibilidade de muitos genes a fatores transcricionais (ativador ou repressor) (GOURBEYRE et al., 2011). Os efeitos transcricionais do butirato em diferentes subconjuntos de células envolvidas no sistema imune intestinal foram estudados *in vitro*: neutrófilos (VINOLO et al., 2009), enterócitos (LEUNG et al., 2009) e células dendríticas (WANG et al., 2008). Outro experimento *in vitro* com enterócitos, demonstrou que o butirato melhorou a barreira intestinal, pois regulou a montagem de proteínas nas junções da parede celular (PENG et al., 2009). Esse AGCC é principalmente produzido pelos gêneros *Clostridium*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*, enquanto outros AGCC, como acetato ou propionato, são quase

exclusivamente produzidos por bactérias produtoras de ácido láctico como as Bifidobactérias e Lactobacillus. Outros ácidos graxos de cadeia curta também possuem papel importante na regulação do sistema imune. Cavaglieriet al. (2003) mostraram que os linfócitos colhidos, quando cultivados com acetato, propionato e butirato produziram maiores concentrações de IL-10, enquanto o butirato sozinho teve pouco efeito.

Além disso, ao estimularem o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, os prebióticos podem modular o sistema imune de maneira benéfica. Estas populações bacterianas produzem substâncias com propriedades imunoestimulatórias. Tais substâncias interagem com o sistema imune, promovendo a produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrofágica e indução de síntese de maiores quantidades de imunoglobulinas (MACFARLANE & CUMMINGS, 1999).

Uma maneira de se avaliar a resposta imune é por meio do emprego do teste de fagocitose e burst oxidativo. Fagocitose é por definição, o intervalo compreendido desde a internalização celular de uma partícula, até sua digestão. Os patógenos se ligam com receptores presentes na membrana celular (HENDERSON et al., 1993; INOUE et al., 1994), com isso os neutrófilos fagocitam o material particulado, o fagossomo se une com o lisossomo e produz estrutura denominada fagolisossomo. Os grânulos de estoque fundem-se ao fagolisossomo e o material englobado é degradado e produzem citocinas com função pró-inflamatória, como TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-8 e citocinas que modulam as atividades de linfócitos T e B, como o antagonista de receptor IL-1 e TGF- β . As membranas dos patógenos tornam-se permeáveis e são destruídas no processo chamado como burst oxidativo, devido a liberação de defensinas e oxidases que geram espécies reativas de oxigênio [ERO (PIER, 2004)]. *Burst* oxidativo é a metabolização do oxigênio molecular a O₂- pelo sistema NADPH oxidase, que induz ao aumento no consumo de oxigênio não-mitocondrial e a formação de metabólitos reativos do oxigênio. Estas substâncias são fundamentais para a destruição de microrganismos ingeridos para as células fagocíticas. Já para as células não-fagocíticas, o metabolismo oxidativo aumentado indica ativação celular. Os métodos de citometria de fluxo para determinação do *burst* oxidativo têm como objetivo a mensuração das reações oxidativas

intracelulares, de forma individual. As células são permeadas por uma substância precursora não-fluorescente, que é oxidada pelos componentes do *burst* oxidativo, a um produto fluorescente (ADAMSON & SLOCOMBE, 1995).

2.4. PREBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE CÃES E GATOS

Prebióticos são alimentos funcionais empregados com frequência nas formulações de alimentos industriais para cães e gatos, principalmente por suas características físicas. Eles são carboidratos complexos, que podem servir de substrato para bactérias fermentadoras e, os produtos dessa fermentação podem influenciar de maneira positiva a microbiota (ROBERFROID, 2010). De forma diferente, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício para a saúde do hospedeiro (WHO, 2005). Já os simbióticos são compostos por prebióticos e probióticos (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2012). Como os microrganismos são facilmente inativados no processo de extrusão e pelo pH do estômago, os prebióticos são os mais utilizados pelas indústrias para compor a formulação de alimentos.

De maneira geral, pôde-se observar em estudos com cães e gatos que mesmo em inclusões abaixo de 1,0% da formulação, os prebióticos foram capazes de influenciar na modulação da microbiota fecal dos animais. Dentre os prebióticos avaliados, o FOS e o MOS foram, respectivamente, os principais objetos de estudo avaliados e associaram-se a redução de *Clostridium perfringens*. Além disso, pode-se perceber a partir do levantamento realizado que em algumas vezes os prebióticos interferiram nos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e em outros parâmetros relacionados ao desenvolvimento de microbiota, como o aumento de AGCC, AGCR e pH fecal. Com relação à imunidade, o MOS foi relacionado com a modulação de população de linfócitos em cães.

Com base nos resultados presentes atualmente na literatura, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de mais pesquisas nesse âmbito da nutrição de

animais de companhia, tendo em vista o grande potencial dos prebióticos na modulação da imunidade e da microbiota intestinal.

No quadro 1 estão apresentados de forma sucinta, os resultados dos principais trabalhos publicados na literatura que avaliaram o emprego de prebióticos na alimentação de cães e gatos saudáveis.

Quadro 1: Resultados de pesquisas com o uso de prebióticos na digestibilidade dos nutrientes, microbiota e produtos da fermentação de cães e gatos

Autor	espécie	Fonte	nível de inclusão	Principais resultados
Sparkers et al. (1998)	gatos	FOS	0,75%	Aumento em <i>Lactobacillus spp.</i> e <i>Bacteroides spp.</i> , seguido de redução em <i>E. coli</i> tendência em <i>C. perfringens</i> .
Strickling et al. (2000)	cães	XOS, FOS e PCL	0,5%	PCL: tendência à redução em ácido butírico ileal e em <i>Clostridium perfringens</i> fecal, seguido de aumento em ácido propiônico ileal em comparação às demais fontes (FOS e XOS). O grupo controle apresentou maior concentração ileal de ácido butírico em comparação ao FOS, MOS e XOS.
Hesta et al. (2001)	gatos	Oligofrutose e inulina	3,0; 6,0 e 9,0%	Ambos aditivos reduziram a digestibilidade aparente da proteína bruta e gordura. Inulina: aumento na concentração fecal de AGCC.
Swanson et al. (2002a)	cães	FOS, PCL e FOS + PCL	1,0g em cápsula	PCL: redução em aeróbios totais e tendência a redução na digestibilidade ileal. Tendência a aumento em <i>Lactobacillus spp.</i> FOS + PCL: tendência à redução em anaeróbios totais.
Swanson et al. (2002b)	cães	FOS+MOS	2,0g FOS + 1g MOS cápsula	FOS +MOS: aumentou concentrações de bifidobactéria fecal, lactobacilli fecal e ileal, alta concentração de linfócitos sanguíneos e baixa de neutrófilos.
Swanson et al. (2002c)	cães	FOS, MOS, FOS+MOS	1,0g (cápsula)	MOS: tendência na redução da concentração de aeróbios totais. FOS+MOS: tendência em baixa concentração de anaeróbios totais.
Zentek et al. (2002)	cães	PCL, TGOS, latose e lactulose	1,0g/kg de PC/dia	PCL: redução na digestibilidade dos nutrientes e na excreção fecal de amônia.
Flickinger et al. (2003)	cães	Frutanos (inulina e FOS) e FOS	0,0; 1,0; 2,0 e 3,0g/dia	Frutanos: redução na digestibilidade aparente dos nutrientes, tendência à redução na concentração fecal de amônia e tendência a aumento em AGCC. FOS: tendência a aumento na digestibilidade ileal e redução linear na concentração de <i>C. perfringens</i> .
Propst et al. (2003)	cães	Inulina e oligofrutose	0,3; 0,6 e 0,9%	Oligofrutose: aumento linear em aminos biogênicas. Inulina e oligofrutose: redução nos coeficientes de digestibilidade aparente. Aumento em amônia e em determinados ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.

Continuação

Grieshop et al. (2004)	cães	Chicória, PCL e Chicória + PCL	1,0%	PCL: redução na concentração fecal de <i>E. coli</i> , aumento em <i>Bifidobacterium spp.</i> Chicória: aumento de <i>Bifidobacterium spp.</i> e tendência a aumento da digestibilidade de gordura.
Apanavicius et al. (2007)	cães	FOS e inulina	1,0%	Inulina: aumento em AGCC e <i>Lactobacillus spp.</i> fecal.
Middelbos et al. (2007a)	cães	Polpa de beterraba, celulose e blends (celulose + FOS + PCL	2,5%	Celulose: redução na digestibilidade aparente em comparação ao controle. Polpa de beterraba: aumento em <i>Bifidobacterium spp.</i> e determinados AGCC em comparação ao grupo controle. Blends: redução da digestibilidade aparente e aumento em determinados AGCC.
Middelbos et al. (2007b)	cães	PCL	0,0; 0,05; 0,25; 0,45 e 0,65%	Comportamento cúbico na digestibilidade aparente de nutrientes e redução linear e tendência a comportamento cúbico para <i>E. coli</i> , pelas técnicas de plaqueamento e PCR em tempo real, respectivamente. Tendência a comportamento cúbico para <i>C. perfringens</i> e <i>Lactobacillus spp.</i>
Barry et al. (2009)	cães	FOS e inulina	0,2 e 0,4%	Inulina: aumento linear na digestibilidade ileal e aparente, comportamento quadrático para os AGCC. FOS: aumento linear na digestibilidade ileal e comportamento quadrático para digestibilidade aparente, bem como significância ou tendência quadrática em determinados ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.
Barry et al. (2010)	gatos	Celulose, FOS e Pectina	4,0%	As fibras fermentáveis apresentaram elevação na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, amônia, aminas biogênicas, <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> e redução na digestibilidade aparente da proteína bruta e gordura, com comportamento variável dependendo da fonte de fibra quando comparadas à celulose.
Faber et al. (2011)	cães	GGMO	0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0%	Aumento linear na digestibilidade aparente da matéria seca e concentração fecal de ácido acético, propiônico e AGCC total. Redução na digestibilidade aparente da proteína bruta e ácido butírico. Modulação em <i>Bifidobacterium spp.</i>

Conclusão

Kanakupt et al. (2011)	gatos	FOS, GOS, FOS + GOS	0,5% FOS; 0,5% GOS e 1,0% GOS+MOS	FOS + GOS: aumento em ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e redução na digestibilidade aparente da proteína bruta. FOS, GOS e FOS + GOS: aumento na contagem fecal de <i>Bifidobacterium spp.</i>
Santos (2015)	gatos	PCL	0,2; 0,4 e 0,6%	Aumento linear de <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , ácido butírico e aminas biogênicas. Redução linear em <i>Clostridium perfringens</i> e quadrática no grupo <i>E. coli</i> - <i>Hafnia alvei</i> - <i>Shigella spp.</i>
Matheus (2016)	gatos	leveduras com metabólitos ativos	0,3 e 0,6%	Redução da concentração de ácido láctico, <i>Clostridium perfringens</i> e ácido isovalérico.
Pawar et al.(2017)	cães	MOS	15,0g/kg de dieta	A percentagem de subpopulações de linfócitos CD4+ e a proporção de CD4+:CD8+ foram maiores no grupo MOS.
Garcia-Mazcorro et al. (2017)	cães e gatos	FOS + inulina	0,45%	Dose baixa: menor abundância de Gammaproteobacteria e maior abundância de Veillonellaceae em gatos, enquanto Staphylococcaceae apresentou maior abundância em cães. Dose alta: menor abundância de Dorea (família Clostridiaceae) e maior abundância de Megamonas e outros membros (desconhecidos) de Veillonellaceae em cães.
Santos (2017)	cães	levedura com metabólitos ativos	0,3 e 0,6%	Alterou a digestibilidade da (FB, PB, EM), melhorou a fagocitose de neutrófilos.
Pinna et al. (2018)	cães	FOS + níveis de proteína	1,5g/kg	FOS: resultaram em maior digestibilidade de MS, Ca, Mg, Na, Zn e Fe. Aumento de bifidobactérias. Interações FOS + proteína: em relação ao pH fecal, ácido propiônico, ácido acético a ácido propiônico e ácido acético a n-butírico para ácido propiônico.

Fonte: (RENTAS, 2018).

AGCC: ácido graxo de cadeia curta; PCL: parede celular de Levedura; FOS: fruto-oligossacarídeos; GOS: galactooligossacarídeos; MOS: mananoligossacarídeos; XOS: xilo-oligossacarídeos; GGMO: galacto glucônico manano oligossacarídeos

2.5 GOS

Os galactooligossacarídeos são considerados oligossacarídeos com efeito prebiótico (FAI & PASTORI, 2015). Os oligossacarídeos são moléculas de carboidratos complexos, formados por vários monossacarídeos, ligados através de ligações glicosídicas covalentes. Eles podem ser encontrados naturalmente na composição de alguns alimentos e tecidos vegetais, mas também são sintetizados no metabolismo de animais e microrganismos (MARTINS & BURKERT, 2009). Podem ser produzidos a partir da lactose por atividade de transgalactosilação da enzima beta-galactosidase (figura 1) são classificados como GOS. Eles possuem grau de polimerização entre 2 e 10 com uma glicose terminal, sendo compostos de di-, tri-, tetra- ou pentassacarídeo, contendo principalmente unidades de galactose ligadas à lactose (FAI & PASTORI, 2015).

Esses compostos são considerados prebióticos por serem ingredientes nutricionais não digeríveis, os quais produzem benefícios ao hospedeiro por estimularem de forma seletiva o crescimento e a atividade de um grupo ou mais de bactérias intestinais benéficas (ROBERFROID et al., 2010). Para serem classificados como prebióticos, essas substâncias devem apresentar como características: incapacidade de serem digeridas ou parcialmente pelo hospedeiro, não serem absorvidas no intestino delgado, pouco fermentáveis por bactérias orais e patogênicas do trato gastrointestinal e, potencial em serem fermentadas por microrganismos benéficos (CRITTENDEN & PLAYNE 2009).

A formação do GOS ocorre a partir de substratos ricos em lactose, como o leite e o soro do leite. O acréscimo de soro do leite a uma base láctea serve de substrato à ação da β -galactosidase, que implica no aumento da disponibilidade de lactose no meio, no incremento de proteína e na redução da atividade de água. A taxa de conversão da lactose aumenta com o incremento da concentração inicial do substrato, tendo em vista o efeito de redução da atividade de água na solução (PESSELA et al., 2003). Devido à conformação β das ligações de seus monômeros, o GOS é resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, as quais possuem especificidade para quebrar ligações α -

glicosídicas. Por isso, são classificados como não digeríveis (ROBERFROID, 2010).

Figura 1. Rotas enzimáticas de conversão da lactose por β -galactosidase

Fonte: (MARTINS & BURKERT, 2009)

Além de serem produzidos de forma industrial, os GOS são encontrados naturalmente no leite materno de algumas espécies. Os galactooligossacarídeos presentes no leite humano vem sendo estudados há mais de 70 anos como fatores bifidogênicos e prebióticos na microbiota de crianças (MARTINS & BURKERT, 2009).

Eles resistem aos processos digestivos no intestino delgado e são hidrolisados a pequenos oligômeros ou monômeros pelas bactérias anaeróbias do cólon, em especial as bifidobactérias. Nos processos metabólicos de fermentação, os galactooligossacarídeos servem de fonte de energia para proliferação destes microrganismos (ROBERFROID et al., 2010). Além do mais, são considerados fatores bifidogênicos, já que servem de substrato para as bifidobactérias e assim, estimulam seu metabolismo e crescimento na microbiota intestinal (ROBERFROID, 2007).

Alguns estudos associaram o GOS à redução da adesão de leucócitos em paredes endoteliais, o que pode indicar possível efeito imunorregulador desse carboidrato (KUNZ & RUDLOFF, 2006). Isso ocorre principalmente pela

semelhança entre esse oligossacarídeo com as glicoproteínas que formam a parede celular da mucosa intestinal (BENGMARK & ORTIZ DE URBINA, 2005). O efeito antiadesivo do GOS, em especial contra a *Escherichia coli* enteropatogênica, também foi estudado em ratos por Shoaee et al. (2006). Nos resultados foi observado desempenho superior do GOS em relação a outros prebióticos, o mesmo inibiu a aderência da *E.coli* em 48%, quando comparado com o grupo controle.

Cheng et al. (2018) avaliaram o efeito da suplementação dietética de GOS na microbiota e nas concentrações de alguns metabólitos em ratos. Eles observaram mudanças em 21 metabólitos circulantes, incluindo ácido oleico, ácido araquídico e ácido docozanóico, os quais diminuíram nos animais alimentados com GOS. A síntese de ácidos graxos e a concentração de triglicerídeos no sangue diminuíram nos camundongos alimentados com GOS em comparação com o controle, sugerindo que o GOS pode melhorar o metabolismo lipídico nesses roedores.

Poucos estudos foram realizados com a inclusão de GOS na alimentação de cães e gatos. Kanakupt et al. (2011) relataram que a utilização desse prebiótico na dieta de gatos aumentou a contagem fecal de *Bifidobacterium* spp. Essa mudança na microbiota foi apontada em outros estudos em humanos e a mesma foi considerada como responsável pela diminuição de produtos putrefativos nas fezes, redução da concentração de colesterol plasmático e redução na incidência de câncer colorretal (CHONG et al., 2014; VITETTA et al., 2014).

Anthony et al. (2006) avaliaram possíveis efeitos toxicológicos ou adversos no consumo de GOS em ratos. Foram utilizados xaropes comerciais cuja formulação continha 45% de GOS. Os autores observaram que ingestões diárias na faixa de 2,5 a 5,0g/kg de peso corporal ao dia, ao longo de 90 dias, não resultaram em efeitos nocivos aos animais.

2.2. BLENDS PREBIÓTICOS

Os blends prebióticos são fórmulas comerciais, onde são empregados mais de um ingrediente funcional. Algumas empresas atuantes no mercado de pet food investem nesses compostos, cujas apresentações comerciais são muito variáveis, sendo de difícil comparação. Poucos estudos foram realizados utilizando blends comerciais na alimentação de cães e gatos. Middelbos et al. (2007) realizaram um estudo com cães e avaliaram um blend constituído por celulose, frutooligossacarídeo (FOS) e parede celular de levedura. Os autores observaram que a utilização do blend aumentou a produção total de ácidos graxos de cadeia curta. Kanakupt et al. (2011) estudaram um blend composto por FOS e GOS e concluíram que o mesmo além de resultar em aumento da contagem de *Bifidobacterium* spp., também modulou a produção de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada em gatos. Outro estudo realizado por Swanson et al. (2002) demonstrou que a mistura de MOS e FOS resultou na diminuição da concentração de bactérias anaeróbicas totais nas fezes de cães.

2.6.1. MOS

Os MOS são oligossacarídeos não digeríveis, extraídos da parede celular de levedura. Assim como os GOS, eles possuem efeito prebiótico, porém, o mecanismo de ação deste difere dos demais. Os efeitos dos MOS foram atribuídos à nutricinas, já que não são nutrientes diretos para a microbiota intestinal ou para o hospedeiro, porém podem produzir efeito positivo na microbiota intestinal, saúde e desempenho dos animais (MUHAMMAD et al., 2017).

Os principais efeitos descritos na literatura dos MOS estão relacionados ao bloqueio da colonização dos patógenos e à estimulação do sistema imunológico. O uso de MOS como bloqueador de colonização de patógenos evoluiu do conceito de que alguns açúcares como manose poderiam ser usados como inibidores da adesão de patógenos às células intestinais (TORRECILLAS et al.,

2014). A adesão bacteriana, que é mediada pela interação de bactérias com grupos específicos de carboidratos presentes na superfície celular por meio de lectinas específicas, é um passo necessário na colonização e patogênese microbiana (BAVINGTON & PAGE, 2005). Portanto, o objetivo da inclusão de MOS em alimentos é reduzir a ligação intestinal de bactérias patogênicas por meio de um componente que resiste à passagem ao longo do intestino durante a digestão e, que mimetize os grupos específicos de carboidratos das células intestinais. Esse mecanismo pode favorecer a adesão bacteriana ao MOS e sua remoção com as fezes, portanto reduzem a incidência e a gravidade do potencial da doença (TORRECILLAS et al., 2014).

Além disso, o MOS pode atuar no desenvolvimento benéfico da microbiota e na sustentação da eubiose, as quais tem importante papel nos mecanismos de defesa do organismo e na saúde do intestino, como teorizado por Williams et al. (2001). Os resultados de estudos sugerem que a suplementação de MOS em dietas para aves pode minimizar a contagem de bactérias patogênicas do intestino grosso após alta exposição a patógenos (WHITE et al., 2002; CASTILLO et al., 2008). A suplementação de MOS foi de fato acompanhada de aumento de gêneros benéficos presentes na microbiota, especialmente lactobacilos (REKIEL et al., 2007). Outro experimento também confirmou o impacto benéfico do MOS em diminuir a concentração de amônia intestinal (JUSKIEWICZ et al., 2003). Dados documentados na literatura indicaram que dietas com MOS podem reduzir de forma significativa o número de patógenos. Em alguns estudos com aves, constatou-se efeito positivo considerável sobre a estrutura histológica do intestino em frangos de corte (MUHAMMAD et al., 2017). Da mesma forma, há evidências que podem aumentar a razão entre a altura das vilosidades / altura das criptas em frangos jovens e em perus (MUHAMMAD et al., 2017).

O primeiro trabalho que avaliou o uso oral de MOS em cães foi realizado por Swanson et al. (2000). Nesse estudo, foi utilizado 1g de MOS e 2g de FOS encapsulado como tratamento, pelo período de 14 dias. Os autores observaram que o grupo que recebeu esse blend apresentou aumento nas contagens de bifidobactéria fecal, lactobacilos fecal e ileal, aumento na concentração de linfócitos circulantes e redução de neutrófilos, quando comparados com o grupo

controle. Nessa mesma linha, o estudo mais recente que empregou esse prebiótico na alimentação de cães foi realizado por Pawaret al. (2017). Os autores suplementaram por via oral 15g de MOS por kg de alimento caseiro por 150 dias e, como resultado, obtiveram aumento nas porcentagens de subpopulações de linfócitos CD4+ e na proporção de CD4+:CD8+ no grupo tratado em relação ao grupo controle.

2.6.2. FOS

Os FOS são carboidratos de cadeia longa provenientes de frutanos encontrados em famílias de mono e dicotiledôneas. A principal espécie de planta empregada pela indústria para extração de frutanos é a chicória. Nessa planta, o FOS é formado por hidrólise da inulina, após o surgimento da inflorescência. Podem ser produzidos em escala industrial de duas maneiras: por hidrólise enzimática parcial da inulina, ou a partir da sacarose por meio de síntese enzimática (transfrutossilação), o que origina dois produtos diferentes (KAUR & GUPTA, 2002).

Assim como os GOS, os FOS possuem em sua conformação monômeros ligados através de β ligações, o que os torna resistentes à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal (ROBERFROID, 2010). Ao chegarem no cólon, esses compostos podem então ser fermentados por populações microbianas presentes no local. Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são bactérias fermentadoras de carboidratos. Os produtos dessa fermentação trazem benefícios à saúde do hospedeiro (SLAVIN, 2013).

Alguns estudos demonstraram que esse prebiótico pode melhorar a saúde de animais de produção (CHEN et al., 2017). A explicação para a diminuição da mortalidade, maior crescimento ou imunomodulação pode ser atribuída à diminuição de bactérias nocivas e/ou aumento de espécies seletivas de bactérias promotoras de saúde gastrointestinal (MAHIOUS et al., 2006; LI et al., 2007; ZHOU et al., 2007). Alguns grupos bacterianos podem fermentar o FOS. Os subprodutos de tal fermentação, principalmente os ácidos graxos de cadeia curta

(AGCC), atuam de maneira benéfica na manutenção da eubiose e também podem atuar como promotores de crescimento (SUKOR et al., 2016; NG & KOH, 2016).

Estudos recentes demonstraram que a suplementação desse aditivo pode modular a microbiota fecal de cães e gatos. Apanavicius et al. (2007) observaram que a inclusão de 1,0% de FOS e inulina no alimento resultou em aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta totais e *Lactobacillus* spp. fecal. Kanakupit e colaboradores (2011) observaram que a inclusão de FOS resultou em aumento da concentração de *Bifidobacterium* spp fecal em comparação ao grupo controle.

2.6.3. β -GLUCANOS

Os β -glucanos são carboidratos constituídos por monômeros de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4 alternadas aos monômeros de glicose, constituídos por ligações β -1,3. Eles são os principais componentes estruturais das paredes celulares de leveduras, fungos e algumas bactérias. Também podem ser encontrados em cereais, como cevada e aveia, os quais possuem β -glucanos nas paredes celulares do endosperma (BROWN et al., 2003).

Dependendo da fonte, existem claras diferenças na estrutura macromolecular entre os β -glucanos. Os que estão presentes na parede celular de leveduras e fungos possuem resíduos de glicose 1,3 β ligados com pequeno número de ramificações ligadas a 1,6 β . Em contraste, as paredes celulares de aveia e cevada contêm β -glucanos não ramificados, porém com resíduos de glicose unidos através de ligações 1,3 e 1,4 β . Enquanto os β -glucanos de origem bacteriana apresentam apenas ligações lineares do tipo β -1,3 entre seus monômeros (BROWN et al., 2003). Essas características podem influenciar seus efeitos imunomoduladores (VOLMAN et al., 2008).

O efeito imunomodulador dos β -glucanos vem sendo estudado nos últimos anos em algumas espécies. Davis et al. (2004) demonstraram que a ingestão diária de β -glucano de aveia neutralizou a diminuição da resistência antiviral a macrófagos, induzida pelo estresse do exercício em camundongos. Rice et al.

(2005) encontraram melhora da sobrevivência em camundongos desafiados com *Staphylococcus aureus* ou *Candida albicans* após a administração oral desse aditivo. Apenas dois estudos avaliaram a resposta imune após suplementação dietética de β -glucano em cães. Os dois demonstraram que o β -glucano pode estimular as respostas imunológicas celulares e humorais após a vacinação (ALTUG et al., 2010; STUYVEN et al., 2010).

O mecanismo de ação desse nutracêutico envolvido na melhora da imunidade ainda não está bem definido. Porém, acredita-se que após a ingestão, o β -glucano entra em contato com o sistema imune presente na mucosa intestinal, células epiteliais intestinais e células imunes das placas de Peyer, as quais desempenham papel importante na regulação do sistema imunológico (VOLTMAN et al., 2008). Tem sido sugerido também, que os efeitos protetores da administração oral de 1,3 β -glucanos podem ser mediados através da sua interação com receptores das células M, que são células epiteliais especializadas no transporte de macromoléculas nas placas de Peyer e, também levam ao aumento da produção de citocinas e maior resistência à infecção (VOLTMAN et al., 2008).

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes promotores de saúde intestinal na digestibilidade dos nutrientes, produtos finais da fermentação fecal e em parâmetros imunológicos de cães adultos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2. LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

O experimento foi conduzido nas dependências do Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premier Pet (CDN Premier Pet), localizado na cidade de Dourado - SP, no período de março e abril de 2018.

Foram empregados 24 cães de raças variadas, machos e fêmeas saudáveis, com média de idade de $4,0 \pm 2,0$ anos, com escore de condição corporal entre 4 e 5, segundo Laflamme (1997). Durante o período de adaptação, os animais foram alojados em canis individuais, com dimensões de 2,0 x 5,60m e solário de 2,0 x 4,90m, em área total de 11,2m², providos de cama, ambiente climatizado e, água *ad libitum*. Os animais foram soltos durante o período de 6 horas para realização de atividade física e socialização. No período de coleta, os animais permaneceram nos mesmos canis, porém foram soltos individualmente durante uma hora, com acompanhamento, nas áreas de exercício. Quando os mesmos defecavam, a coleta foi imediatamente realizada.

4.3. DIETAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em seis grupos de acordo com seus pesos metabólicos ($PC^{0,75}$), dentro desses grupos, quatro tratamentos foram distribuídos de maneira aleatória, seguindo um delineamento em blocos casualizados. As dietas experimentais foram extrusadas na Unidade Fabril da Premier Pet, no município de Dourado, São Paulo. Todos os alimentos foram formulados de acordo com as recomendações nutricionais da Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers FEDIAF (2017). Na tabela 1 está apresentada a composição dos alimentos experimentais.

Tabela 1. Proporção de ingredientes dos alimentos experimentais

Ingredientes (%)	CO ¹	GOS ²	<i>BLEND</i> ³ (0,5%)	<i>BLEND</i> ⁴ (1%)
Amido	1,0	1,0	1,0	1,0
Prebiótico	0,0	1,0	0,5	0,0
Milho grão	20,91	20,91	20,91	20,91
Farinha de vísceras de frango	36,0	36,0	36,0	36,0
Quirera de arroz	30,0	30,0	30,0	30,0
Gordura de aves	8,2	8,2	8,2	8,2
Palatabilizante líquido	2,0	2,0	2,0	2,0
Palatabilizante em pó	1,0	0,0	0,5	0,0
Cloreto de potássio	0,43	0,43	0,43	0,43
Sal comum	0,3	0,3	0,3	0,3
Suplemento min/vit ⁵	0,52	0,52	0,52	0,52
Antifúngico	0,1	0,1	0,1	0,1
Antioxidante	0,04	0,04	0,04	0,04

Fonte: (RENTAS, 2018).

¹CO (alimento controle, sem adição de prebiótico); ²GOS [alimento controle com adição de 1,0% de galactooligosacarídeos (mín. 380g/kg)]; ³*Blend* 0,5% [alimento controle com adição de 0,5% Blend Yes Golf: beta glucanos (mín. 150g/kg)], frutooligosacarídeos (mín. 120g/kg), galactooligosacarídeos (mín. 72g/kg), glucomananos (mín. 210g/kg), mananoligosacarídeos (mín. 60g/kg)), ⁴*Blend* 1,0% [(alimento controle com adição de 1,0% de Blend Yes Golf. ⁵Adição 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 e Colina 2000mg.

Após a formulação, os ingredientes foram pesados, moídos, homogeneizados e na sequência extrusados. Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade entre os tratamentos. Os prebióticos foram adicionados após o processo de extrusão, durante o recobrimento dos *kibbles*. Após acrescentar o palatabilizante líquido, os prebióticos foram adicionados juntamente com o palatabilizante em pó. Durante o experimento foram coletadas amostras dos alimentos para realizar análise bromatológica dos mesmos. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 Composição química analisada dos alimentos experimentais

Item	Tratamentos ¹			
	CO	GOS	B1	B2
Matéria seca (%)	91,95	91,80	91,76	91,76
Composição química na MS				
Matéria mineral (%)	6,47	6,61	6,72	6,85
Proteína bruta (%)	27,46	26,93	25,28	27,22
Extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA) (%)	14,17	14,53	14,32	14,37
Fibra bruta (%)	6,30	6,40	5,97	5,83
Extrativos não-nitrogenados (ENN) (%)	45,6	45,53	47,71	45,73

Fonte: (RENTAS, 2018).

¹CO (alimento controle, sem adição de prebiótico); GOS [(alimento controle com adição de 1,0% de galactooligosacarídeos (mín. 380g/kg)]; B1 [alimento controle com adição de 0,5% Blend Yes Golf: beta glucanos (mín. 150g/kg)], frutooligosacarídeos (mín. 120g/kg), galactooligosacarídeos (mín. 72g/kg), glucomananos (mín. 210g/kg), mananoligosacarídeos (mín. 60g/kg)], B2 [(alimento controle com adição de 1,0% de Blend Yes Golf)].

O experimento foi constituído por um período de 30 dias, sendo os 20 primeiros de adaptação aos alimentos testados. Do dia 21 ao dia 25 foram realizadas as coletas de fezes total para análise dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes. A partir do dia 26, foram separados 3 dias para realização de coleta de fezes frescas, para avaliação dos produtos de fermentação. No último dia foi realizada coleta pontual de sangue, por venopunção da veia cefálica para avaliação dos parâmetros imunológicos, conforme as recomendações da AAFCO (2014).

As avaliações em cada fase experimental estão esquematizadas na figura 1. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, seguindo cálculo de quantidade de alimento fornecido com base na equação para predição de necessidade energética do NRC (2006), calculada pela equação $95x(PC)^{0,75} = \text{kcal por dia}$. A determinação do consumo de alimento pelos animais foi realizada diariamente, através do registro das quantidades oferecidas e recusadas. Os animais foram pesados semanalmente para ajustes de quantidade de alimento a ser oferecido, visando a manutenção do peso e escore de condição corporal.

Figura 2. Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais

Rentas (2018). AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta; AGCR: Ácidos graxos de cadeia ramificada.

4.4. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E ESCORE FECAL

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2009). Dessa forma, o consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. As fezes foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento, durante cinco dias. Estas foram pesadas, logo após a coleta e, acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. Ao final do período de coleta, estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal (*pool* fecal). Na sequência foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo, Brasil) na temperatura de 55°C, por no mínimo 72 horas. As fezes pré-secas e as dietas foram então moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo, Brasil), com peneira de 1mm para proceder-se as análises laboratoriais.

Nas fezes e alimentos foram determinados, segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995), os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB). Os extrativos não nitrogenados (ENN) foram calculados através da fórmula: ENN =

100 - (%PB + %EEHA + %FB + %MM). Todas as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Bromatológicas da Premier Pet, localizado na cidade de Dourado, São Paulo.

Baseado nos resultados obtidos em laboratório, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo em hidrólise ácida, fibra bruta e extrativos não-nitrogenados dos alimentos. Estes cálculos foram realizados com a seguinte fórmula:

$$\text{CDAN \%} = \frac{\text{nutriente ingerido g} - \text{nutriente excretado g}}{\text{nutriente ingerido g}} \times 100$$

CDAN = coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes.

O escore fecal foi avaliado ao longo do período de coleta de fezes para a digestibilidade, aos quais foram atribuídas notas de 0 a 5, sendo consideradas: 0 = fezes líquidas; 1= fezes pastosas e sem forma; 2= fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3= fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4= fezes bem formadas e consistentes que não marcam o piso; 5= fezes bem formadas, duras e secas, considerando-se normal valores entre 3 e 4 (CARCIOFI et al., 2008).

4.5. DETERMINAÇÃO DO PH FECAL

Uma única amostra de fezes foi coletada para determinação do pH fecal, a coleta de fezes foi realizada em até 30 minutos após a defecação dos animais. Sua determinação foi realizada por um peagâmetro digital de bancada (Digimed, DM-20, Quimis do Brasil Ltda., São Paulo/SP). Para tanto, foi realizada introdução direta do eletrodo em uma solução de 9:1 de água destilada e fezes, sendo pesados 1,0 grama de fezes, as quais foram diluídas em 9mL de água destilada

e, posteriormente, mensurado pH da solução, conforme metodologia adaptada de Walter, Silva e Perdomo (2005).

4.6. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL NAS FEZES

Para quantificação do nitrogênio amoniacal fecal, as amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação. Após coletadas as fezes, foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para a quantificação do nitrogênio amoniacal fecal foram utilizadas 3,0 gramas das fezes acidificadas com 9mL de ácido fórmico a 16,0%. A mistura foi mantida pelo prazo de sete dias em refrigerador, homogeneizadas diariamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm durante 15 minutos, a 15°C, por três vezes, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e, em seguida alíquotas de 2mL foram diluídas em 13mL de água destilada e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio. A destilação foi realizada com 5mL de solução 2N de hidróxido de potássio e, a titulação com ácido clorídrico 0,005mol/L, conforme Vieira (1980). Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

4.7. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E CADEIA RAMIFICADA

Para estas análises, amostras de fezes foram coletadas em até 15 minutos após a defecação. Após coletadas, foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foram utilizadas 3,0g das fezes acidificadas com 9mL de ácido fórmico a 16,0%. A

mistura foi mantida pelo prazo de sete dias em refrigerador, homogeneizadas diariamente, e posteriormente, centrifugadas por 15 minutos à 15°C em 5.000 rpm, 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). A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foi realizada por cromatografia gasosa (Prominence HPLC, Shimadzu, Tamboré, Brasil) de acordo com ERWIN et al. (1961), com detector de ionização de chama, controlado pelo programa Shimadzu GC Solution e coluna de separação Stalbilwax de 30 metros e 0,53mm, gás hélio como carreador, nitrogênio como make up, oxigênio com regulagem manual e injetor e detector de chama à 250°C, e a temperatura da coluna mantida em 145°C. Para calibração foi utilizada solução de padrão externa com ácido acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico.

A amostra líquida, previamente centrifugada, foi injetada e vaporizada percorrendo, com auxílio do gás de arraste a coluna. Nesta coluna os ácidos vaporizados mais leves percorrem mais rapidamente a coluna, atingindo o detector de ionização de chama. Neste, a corrente formada pela ionização da chama com o ácido é coletada e enviada a um computador na forma de impulso elétrico. Este calcula a concentração da amostra e compara as áreas dos picos formados pela intensidade dessa corrente com a área dos picos formados pela solução contendo o ácido padrão. Desta forma, calcula-se a concentração da amostra através de uma regra de três simples. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

4.8.DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO NAS FEZES

O ácido lático foi mensurado segundo metodologia descrita por Pryce (1969), pelo método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro (QUICK-Lab, DRAKE Eletrônica Comércio LTDA, São José do Rio Preto – SP). Para tal, foram

coletadas 3,0 gramas de fezes frescas coletadas até 30 minutos após a defecação, posteriormente as mesmas foram homogeneizadas e misturadas com 6mL de água destilada (1:2 p/v). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

4.9. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para avaliação imunológica foram realizados ensaios de quantificação das populações de leucócitos sanguíneos, avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e fagocitose por leucócitos no sangue. Essas análises foram realizadas por citometria de fluxo (citometro FACSCalibur™ - *Becton Dickinson Immunocytometry System*™, San Diego, EUA), conforme metodologia descrita por Hasui et al. (1989). Portanto, no ultimo dia de experimento, foi realizada coleta de aproximadamente 3mL de sangue total, por venupunção da veia jugular e, acondicionado em tubo de tampa verde, contendo heparina. Os ensaios da avaliação imunológica foram realizados em tubos de polipropileno para citometria de fluxo. Em cada tubo foram adicionados 100µL de sangue com 200µL de 2,7 diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (0,3mM), os tubos foram então incubados a 37°C por 30 minutos para avaliação de da produção intracelular de ERO. Para realização das provas de fagocitose a esses tubos foram adicionados 2µL de *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* já marcadas com reagente fluorescente Alexa Fluor® conjugate. Após o período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 2.000µL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3mM). Em seguida os tubos foram centrifugados a 250x gpor oito minutos. Após desprezar o sobrenadante e homogeneizar as amostras, procedeu-se a lise hipotônica das hemácias com solução salina (0,2% e 1,6%) e nova centrifugação, esse procedimento foi realizado duas vezes. Por fim, as amostras foram submetidas a leitura em citometro de fluxo conectado ao computador (Macintosh Apple, CA, USA), com o programa CELLQUEST® (*Becton Dickinson Immunocytometry System*™, San

Diego, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos de cada tubo, os dados obtidos nas leituras foram analisadas em software próprio (*Flow Jo Treestar* - versão vX.0.7 para windows). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Figura 3 Identificação das populações de leucócitos e polimorfonucleares no sangue dos cães

Fonte: Rentas (2018).

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004), sendo previamente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias pelo teste F. As variáveis que não atenderam as premissas estatísticas sofreram transformação logarítmica ou raiz quadrada. Quando necessário, houve retirada de *outliers* para atender as premissas estatísticas. Por fim, foi realizada análise de variância pelo PROC MIXED do SAS com as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = variável dependente; μ = média geral; t_i = efeito fixo de tratamento; b_j = efeito fixo de bloco; e_{ij} = erro residual.

5. RESULTADOS

5.2.DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E VARIÁVEIS FECAIS

Todos os animais apresentaram ingestão adequada do alimento, não apresentaram casos de rejeição ou diarreia. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes encontrados no estudo.

Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e escore fecal de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes promotores de saúde intestinal

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de p
	CO	GOS	B1	B2		
	Coeficientes de digestibilidade (%)					
Matéria seca	83,73	82,00	82,48	82,54	1,1213	0,7345
Matéria orgânica	87,01	85,60	86,01	86,16	0,9335	0,7545
Proteína bruta	85,97	83,79	84,46	84,25	1,3828	0,4437
Fibra bruta	73,53	73,16	73,06	74,02	2,1964	0,9856
Extrato etéreo em hidrólise ácida	97,81	97,44	97,9	98,05	0,1694	0,1025
Extrativos não-nitrogenados	83,36	81,31	81,98	82,45	1,3195	0,7381
	Produção fecal					
Escore fecal	3,55	3,71	3,55	3,51	0,0969	0,2737
Produção de fezes (g MN total)	548,81	564,87	533,87	671,54	143,75	0,6822

Fonte: (RENTAS, 2018).

¹CO (alimento controle, sem adição de prebiótico); GOS [(alimento controle com adição de 1,0% de galactooligosacarídeos (mín. 380g/kg)]; B1 [alimento controle com adição de 0,5% Blend Yes Golf: beta glucanos (mín. 150g/kg)], frutooligosacarídeos (mín. 120g/kg), galactooligosacarídeos (mín. 72g/kg), glucomananos (mín. 210g/kg), mananoligosacarídeos (mín. 60g/kg)], B2 [(alimento controle com adição de 1,0% de Blend Yes Golf)]. ²EPM, erro padrão da média; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Pelos dados apresentados na tabela 3, pode-se verificar que não houve diferença nos coeficientes de digestibilidade aparente da MS, MO, PB, EEHA e ENN (p>0,05). Por fim, a inclusão do prebiótico não influenciou a produção fecal na matéria natural e escore fecal (p>0,05).

5.3.DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA, RAMIFICADA, NITROGÊNIO AMONIACAL E ÁCIDO LÁTICO

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de pH fecal e concentração de ácido lático, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.

Tabela 4 Concentração de ácido lático, amônia, pH fecal, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada nas fezes de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes promotores de saúde intestinal

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de p
	CO	GOS	B1	B2		
pH fecal	6,75	6,77	6,65	6,58	0,1246	0,6155
Ácido Lático, mMol/L de MS	2,33	3,47	3,40	3,34	0,3962	0,175
Amônia, mMol/Kg de MS	119,88	133,58	157,58	140,70	15,9033	0,335
Ácidos graxos de cadeia curta, mMol/L MS						
Ácido Acético	22,5	19,98	19,15	22,23	2,0932	0,6061
Ácido Propiônico	14,7	14,16	13,38	15,49	1,3026	0,6621
Ácido Butírico	4,2	3,62	4,87	4,47	0,4914	0,3626
AGCC ³ Totais	41,41	37,78	37,41	42,2	3,5268	0,6957
Ácidos graxos de cadeia ramificada, mMol/L MS						
Ácido Valérico	0,10	0,12	0,15	0,10	0,0291	0,5664
Ácido Iso-Valérico	0,95 ^{ab}	0,80 ^b	1,14 ^a	0,85 ^{ab}	0,0838	0,0423
Ácido Iso-butírico	0,76	0,79	0,85	0,82	0,0904	0,8926
AGCR ⁴ Totais	1,92	1,72	2,15	1,78	0,1796	0,3186
Ácidos Graxos Totais						

Fonte: (RENTAS, 2018).

¹CO (alimento controle, sem adição de prebiótico); GOS [(alimento controle com adição de 1,0% de galactooligosacarídeos (mín. 380g/kg)]; B1 [alimento controle com adição de 0,5% Blend Yes Golf: beta glucanos (mín. 150g/kg)], frutooligosacarídeos (mín. 120g/kg), galactooligosacarídeos (mín. 72g/kg), glucomananos (mín. 210g/kg), mananoligosacarídeos (mín. 60g/kg)], B2 [(alimento controle com adição de 1,0% de Blend Yes Golf)]. ²EPM, erro padrão da media; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05); ³AGCC (ácidos graxos de cadeia curta); ⁴AGCR (ácidos graxos de cadeia ramificada).

Não houve diferença na concentração da maioria dos produtos de fermentação avaliados no estudo (pH, ácido lático, amônia e AGCC). O único efeito encontrado com a inclusão dos diferentes aditivos ocorreu nas concentrações do ácido graxo de cadeia ramificada iso-valérico (p=0,0423). Os animais que consumiram o alimento com adição de 0,5% do *Blend* apresentaram maior concentração deste produto de fermentação nas fezes, quando comparados com os animais que consumiram o alimento GOS. Os grupos que

receberam os alimentos B2 e CO, apresentaram concentrações fecais desse ácido graxo semelhantes aos grupos GOS e B1.

5.4. AVALIAÇÃO DE IMUNIDADE

Na tabela 5 estão apresentados os resultados referentes ao teste de fagocitose e *burst* oxidativo das amostras de sangue dos cães que consumiram os diferentes tratamentos experimentais.

Tabela 5 Resultados dos testes de fagocitose e burst oxidativo de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes promotores de saúde intestinal

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de p
	CO	GOS	B1	B2		
Total de leucócitos (%)	78,90	74,70	75,90	82,35	3,3474	0,2863
Total de células polimorfonucleares(%)	35,38 ^b	60,01 ^a	41,10 ^b	60,26 ^a	2,7541	<0,0001
Produção de EROS basal (%)	94,01	97,21	98,93	94,30	1,6868	0,2481
Intensidade de fluorescência basal	1740,00	1293,67	1281,00	1450,67	225,03	0,1389
Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	56,66 ^b	73,35 ^{ab}	67,31 ^{ab}	81,10 ^a	5,6011	0,0111
Intensidade de fluorescência <i>S. aureus</i>	73,21 ^b	495,83 ^a	152,67 ^b	517,33 ^a	38,76	<0,0001
Fagocitose de <i>E.coli</i> (%)	46,31 ^b	62,88 ^a	52,31 ^{ab}	67,15 ^a	4,0919	0,0067
Intensidade de fluorescência <i>E.coli</i>	151,27 ^b	526,17 ^a	255,17 ^b	510,83 ^a	43,6276	<0,0001

Fonte: (RENTAS, 2018).

¹CO (alimento controle, sem adição de prebiótico); GOS [(alimento controle com adição de 1,0% de galactooligosacarídeos (mín. 380g/kg)]; B1 [alimento controle com adição de 0,5% Blend Yes Golf: beta glucanos (mín. 150g/kg)], frutooligosacarídeos (mín. 120g/kg), galactooligosacarídeos (mín. 72g/kg), glucomananos (mín. 210g/kg), mananoligosacarídeos (mín. 60g/kg)], B2 [(alimento controle com adição de 1,0% de Blend Yes Golf)]. ²EPM, erro padrão da média; n = 6 cães por dieta; ^{a,b,c} Médias nas linhas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Pode-se verificar que não houve diferença para as variáveis: porcentagem total de leucócitos, produção de EROS sem estímulo e intensidade de fluorescência sem estímulo (p > 0,05) entre os diferentes tratamentos. No entanto, o uso de prebiótico mostrou-se benéfico em todos os outros parâmetros avaliados. A porcentagem de células polimorfonucleares em relação ao total de leucócitos foi maior nos animais que consumiram as dietas GOS e B2 (p<0,0001). Em relação ao teste de fagocitose com bactérias gram positivas (*S. aureus*), pôde-se observar que a porcentagem de células que fagocitaram ao menos uma bactéria foi maior no grupo B2 do que no grupo CO (p=0,0111), no entanto, o grupo B2 não diferenciou dos grupos GOS e B1 (p > 0,05). Os grupos GOS e B2

apresentaram médias maiores que o grupo controle no teste de fagocitose com bactérias gram negativas ($p=0,0067$). Porém, os mesmos não foram diferentes de B1, que por sua vez não foi diferente do controle ($p>0,05$). Por fim, o *burst* oxidativo foi avaliado através da intensidade de fluorescência liberadas por células que fagocitaram ao menos uma bactéria. Verificou-se que tanto para estímulo gram positivo quanto gram negativo, os animais alimentados com as dietas contendo 1,0% de GOS ou 1,0% do *Blend* apresentaram intensidade de fluorescência maiores, o que expressa maior quantidade na produção de EROS, do que os animais que receberam as dietas B1 e CO.

6. DISCUSSÃO

6.2. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E VARIÁVEIS FECAIS

Os resultados obtidos no presente estudo em relação a produção fecal e escore fecal corroboram os achados de Strickling et al. (2000), Swanson et al. (2002a), Zentek et al. (2002), Matheus (2016) e Santos (2017) que não encontraram alterações nesses parâmetros. Por outro lado, alguns experimentos como o de Gomes (2009) encontraram aumento linear na produção fecal de cães suplementados com adição de prebiótico e, Middelbos et al. (2007a) com adição de blends prebióticos na dieta, observaram comportamento quadrático. A fonte e a concentração de prebiótico, assim como a matriz nutricional da dieta, são fatores importantes para a atuação destes aditivos sobre a produção fecal. A digestibilidade dos nutrientes, assim como a fermentação dos carboidratos são fatores relacionados com a produção de AGCC, os quais podem modular a absorção de água por efeito osmótico. Este pode ser um efeito dose dependente, já que altas concentrações de AGCC podem contribuir para o aumento do teor de água nas fezes (NRC, 2006) e por consequência, alterar o escore fecal. Tutoros de cães observam a qualidade das fezes de seus animais e este pode ser um critério para auxiliar na decisão da escolha de um alimento comercial. Mesmo sendo um método de avaliação subjetivo, o escore fecal é uma medida importante para avaliação da qualidade das fezes, principalmente em pesquisas com prebióticos (SANTOS, 2015; SANTOS, 2017).

No presente trabalho, a inclusão de prebióticos não alterou os CDAs. A maioria dos estudos com estes promotores de saúde intestinal observaram alterações em pelo menos um dos CDAs dos nutrientes dos alimentos testados. Zentek et al. (2002) observaram diminuição no CDA da MS, PB e ENN em cães suplementados com 1g de MOS por Kg de peso corporal diário, durante 10 dias. Neste mesmo experimento os autores avaliaram uma dieta com inclusão de GOS e não encontraram diferenças nos CDAs em relação ao grupo controle (sem

prebiótico). Strickling et al. (2000) e Swanson et al. (2002a) não observaram alteração nos CDA dos nutrientes no trato digestório total, quando suplementados com MOS. Por outro lado, Matheus (2016) ao avaliar leveduras com metabólitos ativos em gatos observou aumento da digestibilidade da FB. Já Santos (2017), ao avaliar o mesmo prebiótico observou o oposto em cães, assim como Gomes (2009) que observaram efeito quadrático, com a inclusão de 0,15% de parede celular de leveduras (PCL). Da mesma forma, Middelbos et al. (2007b) demonstraram efeito cúbico na digestibilidade da fibra insolúvel, com maiores coeficientes encontrados na inclusão de 0,25% de PCL.

Diferente do presente estudo, Santos (2017) encontrou maior digestibilidade da PB quando não foi adicionado o prebiótico, assim como, Middelbos et al. (2007a) que citaram que o aumento da biomassa microbiana intestinal pode repercutir em redução da digestibilidade aparente da proteína com a inclusão de prebiótico. Swanson et al. (2002a) observaram que o mananoligossacarídeo presente na PCL pode se ligar a proteína da dieta e assim, reduzir sua digestibilidade. Dessa forma, apesar de não ter sido observado aumento na digestibilidade dos nutrientes, o fato dos tratamentos ora testados não terem afetado a digestibilidade pode ser um ponto positivo em relação ao seu emprego em alimentos para cães.

6.3. ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA, RAMIFICADA, NITROGÊNIO AMONIACAL E ÁCIDO LÁTICO

A inclusão de promotores de saúde intestinal não alteraram o pH fecal e a concentração de AGCC fecais no presente estudo. Gomes (2009) verificou que a inclusão de prebiótico (PCL) na dieta resultou em aumento do pH das fezes de cães. Swanson et al. (2002a) não observaram aumento na concentração de lactato nas fezes, por outro lado, houve aumento do pH fecal, o qual foi justificado pela rápida absorção dos AGCC no cólon. No estudo realizado por Matheus

(2016), o ácido láctico apresentou concentração superior nas fezes dos gatos dos grupos que receberam levedura em comparação ao controle. Quanto aos AGCC, o presente estudo corrobora os resultados encontrados por Swanson et al. (2002a) e Zentek et al. (2002) ao avaliarem a suplementação de cães com um grama de prebiótico por quilograma de peso corporal ao dia, sem diferenças. Em outro estudo, Santos (2017) avaliou diferentes níveis de inclusão de parede celular de levedura em cães, também não encontrou diferença em nenhum produto da fermentação. Em gatos, Santos (2015) observou tendência de aumento linear com a inclusão de PCL na dieta. Por outro lado, um estudo realizado em gatos com utilização de GOS e FOS observaram que a inclusão de 1,0% de GOS com FOS aumentou a concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada (KANAKUPT et al., 2011).

Os ácidos graxos de cadeia curta são extremamente importantes para a manutenção da saúde intestinal, pois são produzidos pela fermentação de carboidratos promovida pelas bactérias intestinais e também, a partir do lactato. Diversas espécies bacterianas possuem a capacidade de utilizar o ácido láctico como precursor para a produção de acetato, propionato e butirato. A formação de ácido láctico ocorre pela ação das bactérias do gênero *Bifidobacterium*, o qual será convertido em acetil CoA e servirá de síntese para o ácido acético e precursor de butírico (LOUIS et al., 2007; Santos, 2017). Segundo Slavin (2013), o nível de inclusão do prebiótico, assim como o tempo de utilização e a fonte do mesmo, podem influenciar no seu efeito. Os principais efeitos relacionados aos prebióticos são consequentes à modulação microbiana intestinal, aspecto que ainda necessita de mais estudos, uma vez que não há consenso sobre o tempo necessário para que um prebiótico possa modular a microbiota e assim, resultar nos efeitos esperados.

A amônia em altas concentrações pode causar prejuízos à saúde de cães e gatos, uma vez que é produzida no cólon e pode ser absorvida através da parede intestinal. Ao chegar na corrente sanguínea, a amônia em alta concentração pode levar a alterações sistêmicas e, causar encefalopatia em cães com afecções hepáticas (CÓRDOBA & MUR, 2014). No ambiente intestinal, ela pode reduzir a altura dos vilos intestinais (WILLIAMS, VERSTEGEN & TAMMINGA, 2001),

prejudicando assim a absorção dos nutrientes. Zentek e colaboradores (2002) avaliaram a inclusão de 1g/kg de PC/dia de PCL e observaram diminuição da concentração fecal de amônia nas fezes de cães.

No presente estudo foi observado aumento na produção do ácido graxo de cadeia ramificada iso-valérico. Matheus (2016) obteve resultado parecido com gatos. Tal achado pode ser uma resposta interessante, já que os AGCR são oriundos da fermentação protéica, sendo estes indicativos de atividade de bactérias potencialmente patogênicas. Houve redução na produção desse ácido graxo no tratamento GOS em relação a B1, o que demonstra que este prebiótico pode ter promovido efeito benéfico na modulação microbiana.

6.4. IMUNIDADE

Poucos experimentos avaliaram o efeito de prebióticos sobre a resposta imune de cães e gatos saudáveis. O estudo pioneiro foi de Swanson e colaboradores em 2002, ao avaliarem um *blend* prebiótico composto por FOS e MOS. Os autores observaram maior concentração de linfócitos em relação a quantidade de neutrófilos nos animais tratados. No presente experimento a resposta foi oposta, animais alimentados com prebióticos (GOS e B2) apresentaram maior concentração de células polimorfonucleares. Um estudo mais recente, realizado por Pawar et al. (2017), observou melhora na atividade fagocitária de neutrófilos em animais que consumiram 15g de MOS por kg de alimento. Outros dois experimentos avaliaram *burst* oxidativo e índice de fagocitose em cães e gatos que consumiram prebióticos. Matheus (2016) ao avaliar esses parâmetros em gatos, não encontrou diferença entre os grupos controle e tratado com levedura. Santos (2017) observou que em cães, a inclusão de levedura com metabólitos ativos na dieta melhorou o índice de fagocitose dos animais. Por outro lado, os índices de imunidade não foram afetados pelos *blends* com ou sem PCL no estudo com cães realizado por Middelbos et al. (2007b). Grieshop et al. (2004) observaram redução de linfócitos circulantes nos tratamentos com MOS e MOS + chicória em cães. Já no estudo de Swanson et al.

(2002a), a porcentagem total de células brancas aumentou com a inclusão de MOS.

Tem sido relatado que o GOS pode melhorar as respostas imunes através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (SONG et al., 2014; HOSEINIFAR et al., 2015;). A fermentação de GOS pela microbiota intestinal benéfica pode resultar na produção de AGCCs que podem se ligar a receptores de componentes imunes (GPR43) e subsequentemente afetar componentes da imunidade inata e células inflamatórias (MASLOWSKI & MACKAY, 2011). Além disso, o efeito dos prebióticos nas respostas imunes tem sido atribuído ao aumento do número de bactérias benéficas na comunidade microbiana intestinal, por exemplo, bactérias produtoras de ácido láctico, que possuem paredes celulares com lipopolissacarídeos, os quais podem estimular o sistema imunológico (GANGULY et al., 2012; RINGØ et al., 2014; YOUSEFI et al., 2018).

A atuação dos prebióticos sobre o sistema imune ocorre principalmente de maneira indireta e, esta relacionada com a capacidade de fermentação seletiva de algumas bactérias (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*). Estas bactérias secretam substâncias com propriedades imunomodulatórias, como: lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos (componente da membrana de bactérias gram positivas). Estas substâncias estimulam o sistema imunológico a produzir citocinas, aumentar a proliferação de células mononucleares, melhorar a fagocitose macrófaga e elevar a produção de imunoglobulinas, principalmente IgA, IgM e IgG (ALVARENGA, 2016). Com base em todos os aspectos discutidos nesta seção, no presente estudo não foi observado efeito dos prebióticos testados na modulação dos produtos de fermentação. No entanto, foram observados efeitos importantes em alguns parâmetros imunológicos e estes provavelmente foram devidos a modulação da microbiota, etapa experimental que ainda será executada para a finalização deste estudo.

Pesquisas têm demonstrado que alguns compostos prebióticos específicos (mananas e glucanas), exercem funções antibacterianas, antimutagênica, antitumoral e antioxidante; além de aumentar a produção e estimular a ação de macrófagos e neutrófilos, modificar a imunossupressão e aumentar a resistência às bactérias patogênicas gram-negativas (BROWDER et al., 1990; WILLIAMS et

al., 1996; KOGAN et al., 2002, 2005). Sugere-se que a manose presente na superfície destes compostos possa estimular a produção de uma lectina que se liga a manose, com importante função de auxiliar a fagocitose, fundamental na resposta imune inata a microrganismos (SPRING et al., 2000).

O FOS interage com o TLR2, um receptor da superfície de membrana expresso em macrófagos, células polimorfonucleares (leucócitos polimorfonucleares ou granulócitos) e células dendríticas, que resulta na ativação de células imunológicas através de vias de transdução de sinal (VOGT et al., 2013).

O β glucano pode agir como imunoestimulante e ativar as células imunes através da ligação ao seu receptor específico lectina-1. Este é um receptor de lectina do tipo c expresso na superfície de macrófagos (BROWN et al., 2002; BROWN & GORDON, 2001). O β -glucano com receptor de lectina-1 ativa macrófagos em combinação com TLR2 e sua via de sinalização, que provoca efeito pró-inflamatório resposta e secreta TNF-alfa (YDAV & SCHOREY, 2002). No entanto, quando β 1,3 glucano é administrado por via oral, pode perder seu efeito imunoestimulador ao passar pelo estômago do hospedeiro (KUDRENKO; SANPE & BARNES, 2009). Assim sendo, os mecanismos subjacentes ao β -glucano como imunoestimulante precisam ser mais estudados (SEONG et al., 2014).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que os promotores de saúde intestinal aqui testados não alteraram a digestibilidade dos nutrientes e apresentaram poucos efeitos nos produtos de fermentação fecal. O GOS promoveu redução na concentração do ácido graxo de cadeia ramificada isovalérico. A inclusão de 1,0% de GOS e 1,0% de *blend* promoveu aumento no número de células polimorfonucleares, fagocitose e *burst* oxidativo em cães adultos saudáveis.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, C.A. Carbohydrates Nutricines: Non-digestible oligosaccharides. **Nutricines - Food Components in Health and Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.

ADAMSON, E.J.; SLOCOMBE, R.F. Flow cytometric studies of equine phagocytes following strenuous exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, p. 37-42, 1995.

ALTUG, N.; YUKSEK, N.; AGAOGLU, Z.T. Immunostimulatory effects of aloe vera and β -glucan on cellular and humoral immune responses following vaccination with polyvalent vaccines in dogs. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University**, v. 16, n. 3, p. 405 - 412, 2010.

ALVARENGA, P.V.A. **Mananas e glucanas em dietas para leitões recém-desmamados**. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia. 2016.

ANTHONY, J. C.; MERRIMAN, T.N.; HEIMBACH, J.T. 90-Day oral (gavage) study in rats galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 819-826, 2006.

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 Salmonella challenge in weanling puppies. **Journal of Nutrition**, v.137, p. 1923–1930, 2007.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. AAFCO. **Official publication 2009**, Washington, 2009.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. AAFCO. **Official publication 2014**, Washington, 2014.

BARRY, K. A.; HERNOT, D. C.; MIDDELBOSS, I. S.; FRANCIS, C.; DUNSFORD, B.; SWANSON, K. S.; FAHEY Jr., G. C. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3244-3252, 2009.

BARRY, K.A.; WOJCICKI, B.J.; MIDDELBOSS, 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.

BAVINGTON, C.D.; PAGE, C.P. Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. **Respiration**, v. 72, p. 335 - 344, 2005.

BELOSHAPKA, A.N.; WOLFF, A.K.; SWANSON, K.S. Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 638-644, 2012.

BENGMARK, S.; URBINA, J.J.O. Simbióticos: una nueva estrategia en el tratamiento de pacientes críticos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 2, p. 147-156, 2005.

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.

BLACHIER, F.; MARIOTTI, F.; HUNEAU, J.F.; TOMÉ, D. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 547–562, 2007.

BLAKE, A.B.; SUCHODOLSKI, J.S. Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. **Animal Frontiers**, v.6, n.3, p. 37-42, 2016.

BOULLIER, S.; TANGUY, M.; KADAOU, K.A.; CAUBET, C.; SANSONETTI, P. CORTHÉSY, B. PHALIPON, A. Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5879-5885, 2009. .

BOYE, J.; BETTONI, R.W.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S183–S211, 2012.

BRONS, F.; KETTLITZ, B.; ARRIGONI, E. Resistant starch and the butyrate revolution. **Trends Food Science Technology**, v. 13, p. 251–261, 2002.

BROWN, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINEZ- POMARES, L. Dectin-1 is a major b-glucan receptor on macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 407-412, 2002.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119-1124, 2003.

BROWN, G.D.; GORDON, S. A new receptor for β - glucans. **Nature**, London, v. 413, n. 1, p. 36-36, 2001.

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.; TAKAKURA, F.S.; DE OLIVEIRA, L.D.; TESHIMA, E.; JEREMIAS, J.T.; BRUNETTO, M.A.; PRADA, F. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post prandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 326-336, 2008.

CASTILLO, M.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; TAYLOR-PICKARD, J.A.; PEREZ, J.F.; GASA, J. Use of mannan-oligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function. **Journal of Animal Science**, v.86, p.94-101, 2008.

CAVAGLIERI, C.R.; NISHIYAMA, A.; FERNANDES, L.C.; CURI, R.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. **Life Sciences**, v. 73, n. 13, p. 1683-1690, 2003.

CERBO, A.D.; MORALES-MEDINA, J.C.; PALMIERI, B.; PEZZUTO, F.; COCCO, R.; FLORES, G.; IANNITTI, T. Functional foods in pet nutrition: Focus on dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 161-166, 2017.

CHEN, W.W.; ROMANO, N.; EBRAHIMI, M.; IKHSAN, N. The effects of dietary fructooligosaccharide on growth, intestinal short chain fatty acids level and hepatopancreatic condition of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) post-larvae. **Aquaculture**, v. 469, p. 95-101, 2017.

CHENG, W.; LU, J.; LIN, W.; WEI, X.; LI, H.; ZHAO, X.; JAING, A.; YUAN, J. Effects of a galacto-oligosaccharide-rich diet on fecal microbiota and metabolite profiles in mice. **Food Function**, v. 4, p. 4-15, 2018.

CHONG, E.S.L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 351–374, 2014.

CONLEY, M.E.; DELACROIX, D.L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? **Annals of Internal Medicine**. v. 106, n 6, p. 892-899, 1987.

CÓRDOBA, J.; MUR, R.E. Encefalopatía hepática. **Gastroenterología y Hepatología**. v. 37, n. 2, p. 74-80, 2014.

CRITTENDEN, R.; PAYNE, M.J. Nutrition News.Facts and functions of prebiotics, probiotics and synbiotics. May 2008. **Department of Human Nutrition, K-State Research and Extension, Kansas State University**; Prebiotics. In: Lee YK,

Salminen S, eds. Handbook of Probiotics and Prebiotics. Wiley-Interscience, 2nded; 2008: Chapter 4, p 535-582.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 145-151, 2002.

CVA PetCare Cães e Gatos - Mercado para cães e gatos deve apresentar grande expansão com os pets sendo considerados “filhos” e “bebês” pelas famílias, revela novo Estudo Petcare da CVA Solutions, 2016. Disponível em: <http://www.cvasolutions.com/noticias/noticia105.html/>. Acesso em: 17 jan. 2018.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E.A.; BROWN, A.S.; CARMICHAEL, M.D.; GHAFAR, A.; MAYER, E.P. Effects of oat β -glucan on innate immunity and infection after exercise stress. **Medicine and science in sports and exercise**, Madison, v. 36, n. 8, p. 1321-1327, 2004.

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. 6-17, 2015.

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.

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, p. 1768–1771, 1961.

FABER, T.A.; HOPKINS, A.C.; MIDDELBOS, I.S.; PRICE, N.P.; FAHEY JR., G.C. Galactoglucomannan oligosaccharide supplementation affects nutrient digestibility, fermentation end-product production, and large bowel microbiota of the dog. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 1, p. 103-112, 2011.

FAHEY, G. C. Research needs companion animal nutrition. In: Kvamme, J. L.; Phillips, T. D. (Ed.). **Pet Food Technology**, Mt. Morris: Illinois, 2003. p.135-140.

FAI, A.E.C.; SILVA, J.B.; ANDRADE, C.J.; BUTION, M.L.; PASTORE, G.M. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma* *sukubaensis* and *Pichiakluveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 03, p. 343-350, 2015.

FÉDÉRATION EUROPÉENNE DE L'INDUSTRIE DES ALIMENTS POUR ANIMAUX FAMILIERS. FEDIAF. **Nutritional Guidelines for Cats and Dogs**. Bruxelles: National Academic Press, 2017.

FLICKINGER, E.A.; SCHREIJEN, E.M.W.C.; PATIL, A.R.; HUSSEIN, H.S.; GRIESHOP, C.M.; MERCHEN, N.R.; FAHEY JR.; G.C. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 8, p. 2008-2018, 2003.

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.

GANGULY, S.; DORA, K.C.; SARKAR, S.; CHOWDHURY, S. Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, p. 195 - 199, 2012.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; BARCENAS-WALLS, J.R.; SUCHODOLSKI, J.S.; STEINER, J.M. Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing **PeerJ**, v. 5, p.3184, 2017.

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.

GERMAN, A.J.; HALL, E.J.; DAY, M.J. Analysis of leukocyte subsets in the canine intestine. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 129–145, 1999.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-12, 1995.

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.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 2009. 79p. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP.

GOURBEYRE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 5, p. 685-695, 2011.

GRABER, P.; WILLIAMS, C.A. Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines application au sérum sanguin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 10, p. 193-194, 1953.

GREETHAM, H.L.; GIFFARD, C.; HUTSON, R.A.; COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 640–646, 2002.

GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BRUCE, K.J.; PATIL, A.R.; CZARNECKI-MAULDEN, G.L.; FAHEY JR, G.C. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and man- nan-oligosaccharides. *Arch. Animal Nutrition*, V. 58, 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.

GUILLOTEAU, P.L.; MARTIN, V.; EECKHAUT, R.; DUCATELLE, R.; ZABIELSKI, F.; VAN IMMERSEEL. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 366–384, 2010.

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, p. 301-310, 2011.

HEIJTZ, R.D. Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1-8, 2016.

HENDERSON, L.M.; MOULE, S.K.; CHAPPELL, J.B. The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1- 2, p. 157-162, 1993.

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, n. 5-6, p. 135-141, 2001.

HONNEFFER, J.B.; STEINER, J.M.; LIDBURY, J.A.; SUCHODOLSKI, J.S. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. **Metabolomics**, v. 13, n. 3, p. 26, 2017.

HOOPER, L.V.; WONG, M.H.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P.G.; GORDON, J.I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, p. 881–884, 2001.

HOSEINIFAR, S.H.; ESTEBAN, M.Á.; CUESTA, A.; SUN, Y.Z. Prebiotics and fish immune response: A review of current knowledge and future perspectives. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 23, p. 315-328, 2015.

HUSSEIN, S. H.; SUNVOLD, G. D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: REINHART, G. A.; CAREY, D. P. **Recent advances in canine and feline nutrition**, Wilmington: Orange Frazer Press, v. 3, p. 153-168, 2000.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>. Acesso em: 17 jan. 2018.

INOUE, K.; MINAMI, Y.; TAOA, Y.; IKATA, T.; FUKUZAWA, K. Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: ASAKA, K.; YOSHIKAWA, T. (Ed.). **Frontiers of reactive oxygen in biology and medicine**. New York: CRC Press, 1994. p. 459-461

JUSKIEWICZ, J.; ZDUNCZYK, Z.; JANKOWSKI, J. Effect of adding mannan-oligosaccharide to the diet on the performance, weight of digestive tract segments, and caecal digesta parameters in young turkeys. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 12, p. 133-142, 2003.

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.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

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.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v.109, p.161–165, 2007.

KUDRENKO, B.; SNAPE, N.; BARNES A.C. Linear and branched b (1e3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: implications for dietary immunostimulation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 443-450, 2009.

KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 1341-1346, 2006.

LEUNG, C.H.; LAM, W.; MA, D.L.; GULLEN, E.A.; CHENG, Y.C. Butyrate mediates nucleotide-binding and oligomerisation domain (NOD) 2-dependent mucosal immune responses against peptidoglycan. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 3529–3537, 2009.

LI, P.; BURR, G.S.; GATLIN, D.M.; HUME, M.E.; PATNAIK, S.; CASTILLE, F.L.; LAWRENCE, A.L. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of

Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2763–2768, 2007.

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.

LUPTON, J.R. Microbial degradation products influence colon cancer risk: The butyrate controversy. **The Journal of Nutrition**. v. 134, p. 479–482, 2004.

MACARI, M., MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais**, Campinas: FACTA, 2000. p.161-174.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v. 18, p.999-1003, 1999.

MAHIOUS, A.S.; GATESOUBE, F.J.; HERVI, M.; METAILLER, R.; OLLEVIER, F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). **Aquaculture International**, v. 14, n. 3, p. 219–229, 2006.

MARTINS, M. S. **Leveduras de cerveja e cana-de açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), autolisada e íntegra, na dieta de cães**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 2009.Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP.

MASLOWSKI, K.M.; MACKAY, C.R.; Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**. v. 12, p. 5-9, 2011.

MATHEUS, L. F. O. **Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos**. 2016. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, 2016.

MAYNARD, C.L.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, p. 231-241, 2012.

MIDDELBOS, I.S.; BOLER, B.M.V.; QU, A.; WHITE, B.A.; SWANSON, K.S.; FAHEY JR, G.C. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9768, 2010

MIDDELBOS, 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, 2007b.

MIDDELBOS, 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, p. 3022–3032, 2007a.

MONTILLA, A.; MEGÍAS-PÉREZ, R.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Presence of galactooligosaccharides and furosine in special dairy products designed for elderly people. **Food Chemistry**, v. 172, p. 481-485, 2015.

MUHAMMAD, S.; FAWWAD, A.; ASIF, M.A.; EL-HACK, M.E.A.; EMAM, M.; BHUTTO, A.Z.; MOSHAVERI, A. Use of Mannan- Oligosaccharides (MOS) As a Feed Additive in Poultry Nutrition. **Journal of World Poultry Research**, v. 7, n.3, p. 94-103, 2017.

NAMKUNG, H.; YU, H.; GONG, J.; LEESON, S. Antimicrobial activity of butyrate glycerides toward *Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens*. **Poultry Science**, v. 90, p. 2217–2222, 2011.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; COSTA, R.S.; ROCHA, I.C.A.P.; FERREIRA, E.M.F.C.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; TEIXEIRA, J.A. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v. 115, p. 92-99, 2009.

NG, W.K., KOH, C.B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 4, 2016.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Ant Van Leeuw**, v. 82, p. 279–289, 2002.

OUZGUN, C.; UMO, O.; RUDI, K.; DZUNG, B.D. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 28, n. 1, p. 1348 - 1356, 2017.

PAIXAO, L.A.; CASTRO, F.F.S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Univeritas: Ciência da Saúde**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2016.

PAWAR, M.M.; PATTANAIK, A.K.; SINHA, D.K.; GOSWAMI, T.K.; SHARMA, K. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of animal science and technology**, v. 59, n. 1, p. 11, 2017.

PELÍCIA, K.; MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B; PIZZOLANTE, C.C.; TAKAHASHI, S.E; GARCIA, R.G; MOREIRA, J.; PAZ, I.C.L.A;QUINTEIRO, R.R;; KOMIYAMA, C.M.. Probiotic and prebiotic utilization in diets for free-range broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 2004.

PENG, L.; LI, Z.R.; GREEN, R.S.; HOLZMAN, I.R.; LIN, J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1619–1625, 2009.

PESSELA, B.C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sepabeads supports decreases product inhibition: complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 33, n. 2-3, p. 199-205, 2003.

PETERS, I.R.; CALVERT E.L.; HALL, E.J.; DAY, M.J. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 841–848, 2004.

PIER, G. B.; LYCZAK, J.B.; WETZLER, L.M. **Immunology, Infection, and Immunity**, Washington: ASM Press, p. 718, 2004.

PINNA, C.; VECCHIATO, C.G.; BOLDUAN, C.; GRANDI, M.; STEFANELLI, C.; WINDISCH, W.; ZAGHINI, G.; BIAGI, G. Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n.1, p. 106 - 116, 2018.

PIRES, A.L.L.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

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 lactic acid. **Analist**, v. 94, p.1121-1151, 1969.

REKIEL, A.; BIELECKI, W.; GAJEWSKA, J.; CICHOWICZ, M.; KULISIEWICZ, J.; BATORSKA, M.; ROSZKOWSKI, T.; BEYGA, K. Effect of addition of feed antibiotic flavomycin or prebiotic BIO-MOSS on production results of fatteners, blood biochemical parameters, morphometric indices of intestine and composition of microflora. **Archives Animal Breeding**, Dummerstorf, v. 50, p. 172-180, 2007.

RICE, P.J.; ADAMS, E.L. et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increase resistance to infectious challenge. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, p. 1079-1086, 2005.

RINGØ, E.; DIMITROGLOU, A.; HOSEINIFAR, S.H.; DAVIES, S.J. Prebiotics in Finfish: An Update. In: Merrifield 290 DL, Ringø E, editors. **Aquaculture Nutrition**: John Wiley & Sons, Ltd, p. 360-400, 2014.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to Prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M. R. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. March, p. 830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M.-J.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N.M.; CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **The British Journal of Nutrition**, v. 104, p. S1-63, 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.

ROUND, J.L., MAZMANIAN, S.K., The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 313-323, 2009.

SANTOS, K.M. **Efeitos da suplementação de cães adultos com teores crescentes de levedura dietética na digestibilidade dos nutrientes, produtos da fermentação fecal microbiota e parâmetros imunológicos**. 2017. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

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**. 2015. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

SAS INSTITUTE INC. **SAS User's guide: statistics**. Ver. 9.1.1, SAS Inst., Cary, NC, 2004.

SEONG, K.S.; BECK, B.R.; KIM, D.; PARK, J.; KIM, J.; KIM, H.D.; RINGØ, E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 40-48, 2014.

SILVA, B. J. G. **Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2007.

SILVA, V. K. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré- inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas**. 2006. 151f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SIMPSON, J. M.; MARTINEAU, B.; JONES, W.E.; BALLAM, J.M.; MACKIE, R.I. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. **Microbial ecology**, v. 44, n. 2, p. 186-197, 2002.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**, v. 5, p. 1417-1435, 2013.

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, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 205-211, 2000.

STOKES, C.; WALY, N. Mucosal defense along gastrointestinal tract of cats and dogs. **Veterinary Research**, v. 37, p. 281-293, 2006

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

STUYVEN, E.; VERDONCK, F.; VAN HOEK, I.; DAMINET, S.; DUCHATEAU, L.; REMON, J. P.; GODDEERIS, B. M.; COX, E. Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan to dogs temporally changes total and antigen 1 specific IgA and IgM. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n. 2, p. 281-285, 2010.

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, 2011.

SUKOR, S.A.; TAHER, S.; EHTESHAMEI, F.; ARSHAD, A.; NG, W.-K.; ROMANO, N. Effects of different dietary organic acids on the survival, growth, and hepatopancreatic histopathology of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus*. **Journal of Shellfish Research**, v. 35, p. 555–561, 2016.

SWANSON, K.S.; GRIESHP, 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 nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal Nutrition**, v.132, p. 980–989, 2002a.

SWANSON, K. S.; GRIESHP, C. M.; FLICKINGER, E. A.; MERCHEN, N. R., & FAHEY, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides on colonic microbial populations, immune function and fecal odor components in the canine. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1717S-1719S, 2002c.

SWANSON, K.; GRIESHP, C.; FLICKINGER, E.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R., ... & FAHEY JR, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 309-318, 2002b.

SWANSON, K.; GRIESHP, C.; FLICKINGER, E.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 309-318, 2002.

SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C.Jr. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, p.19-35, 2007.

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**, v. 142, n. 11, p. 1921-1928, 2012.

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 525-544, 2014.

Van EGMOND, M.; DAMEN, C.A.; van SPRIEL, A.B.; VIDRASSON, G., van GARDEREN, E.; van de WINKEL, J.G. IgA and the IgA Fc receptor. **Trends Immunology**, v. 22, p. 205-211, 2001.

VAN IMMERSEEL, F.F.; BOYEN, I.; GANTOIS, L.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, F.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, R.; DUCATELLE, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of Salmonella in poultry. **Poultry Science**, v. 84, p. 1851–1856, 2005.

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. 1980. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980.

VINOLO, M.A.; RODRIGUES, H.G.; HATANAKA, E.; HEBEDA, C.B.; FARSKY, S.H.; CURI, R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clinical Science**, v. 117, p. 331–338, 2009.

VITETTA, L.; BRISKEY, D.; ALFORD, H.; HALL, S.; Coulson, S. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. **Inflammopharmacol**, v. 22, p. 135–154, 2014.

VOGT, L.; RAMASAMY, U.; MEYER, D.; PULLENS, G.; VENEMA, K.; FAAS, M.M.; SCHOLS, H.A.; de VOS, P. Immune modulation by different types of b2 / 1-fructans is toll-like receptor dependent. **PLoS One**, v. 8, n. 7, e68367, 2013.

VOLMAN, J.J.; RAMAKERS, J.D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 276-284, 2008.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; PERDOMO, D. M. X.; Biological response of rats to resistant starch. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 252-257, 2005.

WANG, J.; CHEN, L.; LI, D.; YIN, Y.; WANG, X.; LI, P. Intrauterine growth restriction affects the proteomes of the small intestine, liver, and skeletal muscle in newborn pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 60-66, 2008.

WENK, C. Prebiotics in companion animals. In: LAUE, D. K.; TUCKER, L. A. (Ed.). **Recent advances in pet nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2006. p.47-55.

WHITE, L.; NEWMAN, M.; CROMWELL, G.; LINDEMANN, M. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2619-2628, 2002.

WILLIAMS, B. A. VERSTEGEN, M.W.A. TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, v. 14, p. 207-227, 2001.

YADAV, M.; SCHOREY, J.S. The b-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. **Blood**, v. 108, p. 3168-3175, 2002.

YOO, E. M.; MORRISON, S. L. IgA: an immune glycoprotein. **Clinical Immunology**, v. 116, p. 3 – 10, 2005.

YOUSEFI, S.; HOSEINIFAR, S.H.; PAKNEJAD, H.; HAJIMORADLOO, A. The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 73, p. 192–196, 2018.

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

ZHOU, Z.; DING, Z.; HUIYUAN, L.V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 296–301, 2007.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, v. 8, n. 2, p. 357-366, 1965.