GABRIELA DO VALE POMBO

Efeito da suplementação com levedura viva e levedura viva protegida sobre a digestibilidade aparente total e parâmetros fermentativos de equinos

Pirassununga
2018

GABRIELA DO VALE POMBO

Efeito da suplementação com levedura viva e levedura viva protegida sobre a digestibilidade aparente total e parâmetros fermentativos de equinos

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso

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 Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3600
FMVZ

Pombo, Gabriela do Vale

Efeito da suplementação com levedura viva e levedura viva protegida sobre a digestibilidade aparente total e parâmetros fermentativos de equinos / Gabriela do Vale Pombo. – 2018.

97 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientadora: Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Augusto Gobesso.

1. Cavalos. 2. Conteúdo gástrico. 3. Degradação. 4. Probióticos. 5. Produção de gases.
I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

Comitê de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEVEDURA E LEVEDURA PROTEGIDA SOBRE A DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E PARÂMETROS FERMENTATIVOS DE CAVALOS EM MANUTENÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 9831160316, sob a responsabilidade de **Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso** e equipe: Gabriela do Vale Pombo - 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 18/05/2016.

We certify that the proposal "EFFECT OF SUPPLEMENT WITH YEAST AND YEAST PROTECTED ON DIGESTIBILITY TOTAL AND PARAMETERS FERMENTATIVE HORSES IN MAINTENANCE", utilizing 8 Equines (8 males), protocol number CEUA 9831160316, under the responsibility of **Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso** and team: Gabriela do Vale Pombo - 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 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2016 a 08/2016

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos**

Idade: **5 a 7 anos**

N: **8**

Linhagem: **puro sangue árabe**

Peso: **400 a 550 kg**

Resumo: O uso da suplementação com levedura viva em equinos tem sido estudado, pelo potencial de redução da produção de lactato no intestino grosso e alguns autores relatam, a melhor digestibilidade aparente da proteína. Porém, o uso de levedura viva protegida ainda não foi relatado para a espécie. As informações que se tem sobre o produto é de que a tecnologia de peletização garante a limitação do índice de umidade e temperatura dentro do grânulo. Apesar da peletização o organismo vivo é liberado no intestino. O objetivo do trabalho será avaliar a digestibilidade aparente dos nutrientes e parâmetros de fermentação com a suplementação de levedura viva e levedura protegida em equinos em manutenção. O delineamento experimental será o de quadrado latino duplo balanceado com oito animais, quatro dietas avaliadas por quatro períodos de 23 dias cada, sendo 15 dias de adaptação à dieta, 5 dias de coleta de fezes e 3 semanas de intervalo entre os períodos. As dietas, balanceadas seguindo as recomendações estabelecidas pelo NRC (2007). A digestibilidade aparente dos nutrientes será avaliada a partir da coleta total de fezes dos animais alojados em baias de concreto sem cama. A resposta glicêmica, insulinêmica e teor de endotoxina serão avaliados com coletas de amostras de sangue no primeiro dia de coleta de fezes. A avaliação do pH será feita por meio de pHmetro. Serão avaliados os microrganismos presentes nas fezes e conteúdo estomacal, além da quantificação de levedura, produção de gases e produção de ácidos graxos voláteis. Os dados serão submetidos à análise de variância e aqueles que acusarem significância serão submetidos aos devidos testes de médias ou regressão.

Local do experimento: o experimento será realizado nas dependências do Campus da USP em Pirassununga/SP

São Paulo, 15 de setembro de 2016

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: POMBO, Gabriela do Vale

Título: Efeito da suplementação com levedura viva e levedura viva protegida sobre a digestibilidade aparente total e parâmetros fermentativos de equinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Papai e mamãe,
Meu querido irmão Rodrigo,
A toda a minha família e
Ao meu companheiro André
Dedico essa obra

AGRADECIMENTOS

Á Deus e a toda espiritualidade por iluminarem meus caminhos e decisões.

À minha família que sempre me apoiou e esteve comigo em todos os momentos, sem eles, eu não teria chego até aqui.

Meus avós Waldevino e Agostinho, meus queridos... que Deus esteja com vocês. A minha avó Dona Leda, minha eterna professora, maior exemplo de determinação.

A você André, meu noivo. Muito obrigada pelo apoio, companheirismo, dedicação e paciência, você não é só parte disso, mas fez disso um sonho realizado.

A família Guarnieri Garcia, que me recebeu como uma filha.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre, pelas oportunidades. Apesar dos pesares, deixou-me a vontade pois confiava em mim, ajudando-me em plantões e nos momentos mais difíceis, incentivando-me com sua maneira.

Obrigada aos meus amigos que levarei para toda vida, Filipe (Abeia), Chita (Ássuka), Laura (Costelinha), Bruna, Melzinha e muitos outros que estarão sempre comigo.

Ao Prof. Dr. Ives, que me acompanha desde o Mestrado e sempre foi para mim, um grande exemplo.

Ao Prof. Dr. Julio Balieiro, que mais que um grande profissional, foi um amigo, conselheiro e companheiro.

Ao Prof. Dr. Márcio Brunetto, que também, sempre foi um grande amigo e agora “compadres” de filhotes!

Ao Prof. Dr. “Chico” Rennó e a todos do laboratório LPBL que participaram de altos e baixos, sendo mais que colegas, grandes amigos.

Aos amigos feitos no LabEqui, em especial, Iaçã, Murillo, Hortência, Danone, Saulo, Camila, Flávia, Vitoria, Leticia, Bixiguenta, Isa... obrigada por tudo, desde o apoio e a construção desses resultados, como pela companhia, boas risadas, boas cervejas e muito trabalho!

Obrigada aos funcionários do Departamento, em especial, Dona Edna, Simi, Renata e

Alessandra, pela paciência, ajuda e boas conversas.

À Rose e Rosilda, que sempre estiveram ali para emprestar seus ouvidos e comer um bom bolo!

A Yasmin (Paçoca), que mais que uma grande amiga, esteve ali como uma irmã. Me ajudou, aconselhou, estudamos, revisamos, revisamos mais uma vez, comemos, ficamos sem comer, passamos frio, choramos, rimos, aprendemos, bebemos, brincamos e mais que isso, independente da distância e problemas, sempre estivemos juntas.

A Anita, amiga que me ensinou o gosto pela pesquisa!

Lili, Le, Tati, Mari... amigas de infância que compreenderam sempre minha ausência, tiveram paciência e sempre que possível, arrumávamos um tempo para nós!

Ao pessoal da ABHIR, Chevaux, FEI e do Recinto Municipal de Colina pelas oportunidades geradas, aprendizado e muito amor aos cavalos!

Ao atleta Gustavo Pagotto, que foi um grande amigo e professor, nunca esquecerei seus ensinamentos e filosofias.

Ao pessoal do Regimento de Cavalaria Montada “9 de Julho”, pela confiança e amizade.

Aos colegas e amigos que a pesquisa me deu... UFRRJ, UFMG, UFBA e UFVSF vocês são minha inspiração!

E claro, aos cavalos, muitíssimo obrigada, mais do que uma paixão são minha razão de viver, em especial “nossos gordinhos”, Al-Rhi (neguinho), Maximus (gordinho), Shawan (periquito), Jazz (Manny), Britain (encrenca), Ransey (sujo), Jaffar (magrelo), Tata (meu amor), Malcon (bebê), L’Espoir (velhão) e ao Darius (bolota).

Obrigada a todos!

“Sucesso é conseguir o que você quer e felicidade é gostar do que você conseguiu”

Dale Carnegie

RESUMO

POMBO, G.V. **Efeito da suplementação com levedura viva e levedura viva protegida sobre a digestibilidade aparente total e parâmetros fermentativos de equinos.** 2018. 97f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O uso da suplementação com levedura viva em equinos tem sido estudado, pelo potencial de redução da produção de lactato no intestino grosso sendo relatado por alguns autores, melhora da digestibilidade aparente da proteína bruta. Porém, o uso de levedura viva protegida ainda não foi relatado para a espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar a digestibilidade aparente dos nutrientes e parâmetros de fermentação intestinal e gástrica com a suplementação de levedura viva e levedura viva protegida em equinos em manutenção. O delineamento experimental foi o quadrado latino duplo balanceado com oito animais, quatro dietas avaliados por quatro períodos de 22 dias cada, sendo 15 dias de adaptação à dieta, 5 dias de coleta de fezes (CTF), 1 dia para coleta de conteúdo gástrico e 2 semanas de intervalo entre os períodos. As médias dos tratamentos foram comparadas através de contrastes ortogonais (C1: controle [CTR] *versus* levedura [LEV], levedura protegida [PROT] e levedura viva + levedura protegida [L + P]; C2: L + P *versus* LEV e PROT; C3: LEV *versus* PROT). O nível de significância do teste utilizado foi a 10%. Não foram observados efeitos para pH nas fezes, concentração sérica de fator tumoral alfa, concentrações de ácido lático e ácidos de cadeia curta nas diferentes dietas. Não foi observado significância para a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta quando se usou levedura viva ou protegida ($P=0,0683$). Houve aumento das concentrações de ácido acético com o uso de levedura no conteúdo gástrico ($P=0,0082$). Avaliando a técnica de coleta sugerida, a adaptação realizada para este procedimento de coleta de digesta gástrica apresentou fácil aplicabilidade, com alta tolerância pelos equinos, além de proporcionar perfeita precisão do local de coleta a ser avaliado. A levedura viva e levedura protegida não apresentam efeito quanto a degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro ($P > 0,05$). A fermentação com inóculo de fezes possui maiores taxas de produção de gás quando se utiliza feno como substrato e suplementação com levedura viva ($P=0,0190$). Quando se utiliza de conteúdo gástrico como inóculo, a levedura protegida apresenta menor produção de gases ($P=0,0484$).

Palavras-chave: cavalos, conteúdo gástrico, degradação, probióticos, produção de gases.

ABSTRACT

POMBO, G.V. **Effect of supplementation with live yeast and protected live yeast on a total apparent digestibility and fermentative parameters of horses.** [Efeito da suplementação com levedura viva e levedura viva protegida sobre a digestibilidade aparente total e parâmetros fermentativos de equinos]. 2018. 97f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The use of live yeast supplementation in equines has been studied for the potential reduction of lactate production in the large intestine and is reported by some authors to improve the apparent digestibility of crude protein. However, the use of protected live yeast has not yet been reported for the species. The aim of this study was to evaluate the apparent digestibility of nutrients and parameters of intestinal and gastric fermentation with the supplementation of live yeast and protected live yeast in horses. The experimental design was the double balanced latin square with eight animals, four diets evaluated for four periods of 22 days each, being 15 days of adaptation to the diet, 5 days of collection of feces (CTF), 1 day for collection of gastric content and 2 weeks interval between periods. The treatments were compared by means of orthogonal contrasts (C1: control [CTR] versus yeast [LEV], protected yeast [PROT] and live yeast + protected yeast [L + P]; C3: LEV versus PROT). The level of significance of the test used was 10%. No effects were observed for faecal pH, serum concentration of alpha tumor factor, lactic acid concentrations and short chain acids in the different diets. It was not possible to observe a difference significance on apparent digestibility in nutrients of diets when living or protected yeast ($P = 0.0683$). There was an increase in acetic acid concentrations with the use of yeast in gastric contents ($P = 0.0082$). Evaluating the suggested collection technique, the adaptation performed for this procedure of gastric digestion was easy to apply, with high tolerance by the horses, besides providing perfect accuracy of the collection site to be evaluated. Live yeast and protected yeast have no effect on the *in vitro* degradability of dry matter and neutral detergent fiber ($P > 0.05$). Fermentation with fecal inoculum has higher rates of gas production when hay is used as a substrate and supplementation with live yeast ($P = 0.0190$). When gastric contents are used as the inoculum, the protected yeast presents lower gas production ($P = 0.0484$).

Keywords: horses, gastric content, degradation, probiotics, gas production

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição bromatológica das dietas utilizada e ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais.	55
Tabela 2. Média dos coeficientes de digestibilidade aparente (%CDA) e erro padrão da média (EPM) dos nutrientes, pH das fezes, concentração sérica de fator de necrose tumoral alta (pg/mL-1), concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico nas fezes de cavalos suplementados com levedura viva e levedura protegida.	62
Tabela 3. Parâmetros fecais em função da expressão gênica nos diferentes tratamentos. .	63
Tabela 4. Médias e erro padrão da média (EPM) para concentração plasmática de colesterol total (CT), fração de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL – C), fração de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL- L), fração de colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), triglicérides (TRIG), insulina e glicose nos diferentes tratamentos (LSM; n=32 ¹).	64
Tabela 5. Composição bromatológica (%) das dietas utilizada e ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais.	74
Tabela 6. Médias e erro padrão da média (EPM) das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo gástrico nos diferentes tratamentos (LSM; n=321).	77
Tabela 7. Composição bromatológica (%) das dietas utilizada e ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais.	86
Tabela 8. Degradabilidade, produção de gás <i>in vitro</i> e gás acumulado das fezes, usando feno como substrato, após 48 horas após incubação nos diferentes tratamentos.	89
Tabela 9. Degradabilidade, produção de gás <i>in vitro</i> e gás acumulado das fezes, após 48 horas após incubação nos diferentes tratamentos.	90
Tabela 10. Produção de gás <i>in vitro</i> e gás acumulado do conteúdo gástrico, após as 16 horas após incubação nos diferentes tratamentos.	91

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	HIPÓTESE	17
3.	OBJETIVO	18
3.1.	OS OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
4.	REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1.	<i>CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DO TRATO DIGESTÓRIO DOS EQUINOS</i> 19	
4.2.	<i>ASPECTOS GERAIS E ALIMENTOS PARA EQUINOS</i>	20
4.3.	<i>CARBOIDRATOS E A RESPOSTA GLICÊMICA NA DIETA DE EQUINOS.....</i>	21
4.4.	<i>PROBIÓTICOS E MICROBIOTA INTESTINAL.....</i>	25
4.5.	<i>DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES</i>	32
4.6.	<i>TÉCNICAS IN VITRO DE PRODUÇÃO DE GASES.....</i>	33
4.7.	<i>TÉCNICA DE COLETA DE CONTEÚDO GÁSTRICO EM EQUINOS</i>	37
4.8.	REFERENCIAS	42
5.	CAPÍTULO I – Uso da levedura viva e levedura protegida na dieta de equinos em manutenção	51
5.2.	INTRODUÇÃO.....	53
5.3.	MATERIAL E MÉTODOS	54
5.3.1.	<i>Local</i>	54
5.3.2.	<i>Animais</i>	54
5.3.3.	<i>Delineamento Experimental</i>	54
5.3.4.	<i>Dietas.....</i>	55
5.3.5.	<i>Coletas de fezes</i>	56
5.3.6.	<i>Coletas de sangue</i>	58
5.3.7.	<i>Análises estatísticas.....</i>	60
5.4.	RESULTADOS	61
5.4.1.	<i>Parâmetros fecais</i>	61
5.4.2.	<i>Expressão Gênica.....</i>	62
5.4.3.	<i>Perfil Sanguíneo.....</i>	63
5.5.	DISCUSSÃO.....	64
5.6.	CONCLUSÃO	67

5.7.	REFERENCIAS	67
6.	CAPÍTULO II – Validação da técnica de coleta de conteúdo gástrico oral de equinos suplementados com levedura viva <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
6.2.	INTRODUÇÃO	71
6.3.	MATERIAL E MÉTODOS	72
6.3.1.	Local	72
6.3.2.	Animais	72
6.3.3.	Período Experimental.....	73
6.3.4.	Dietas.....	73
6.3.5.	COLETAS DO CONTEÚDO GÁSTRICO	74
6.3.6.	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO GRAXOS DE CADEIA CURTA.....	75
6.3.7.	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	76
6.3.8.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	76
6.4.	RESULTADOS	76
6.5.	DISCUSSÃO.....	77
6.6.	CONCLUSÃO	80
6.7.	REFERENCIAS	80
7.	CAPITULO III- Degradação e produção de gases <i>in vitro</i> com diferentes inóculos na dieta de equinos suplementados com levedura viva e levedura protegida.....	82
7.1.	INTRODUÇÃO	83
7.2.	MATERIAL E MÉTODOS	84
7.1.1.	Local	84
7.1.2.	Animais	84
7.1.3.	Período Experimental.....	85
7.1.4.	Dietas.....	85
7.2.5.	PRODUÇÃO DE GASES IN VITRO FEZES	86
7.2.6.	PRODUÇÃO DE GASES IN VITRO CONTEÚDO GÁSTRICO	88
7.2.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	89
7.2.	RESULTADOS	89
7.3.	DISCUSSÃO.....	92
7.4.	CONCLUSÃO	94
7.6.	REFERENCIAS	94

8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
9.	IMPLICAÇÕES	97

1. INTRODUÇÃO

O equino é classificado como herbívoro não-ruminante devido às suas características anatômicas, possuindo capacidade para a digestão de alimentos distintos, desde açúcares, amido, proteína ou gordura através de enzimas próprias do estômago e intestino delgado, incluindo material fibroso que através da fermentação microbiana pode ser digerida e aproveitada no intestino grosso (MEYER, 1995).

A produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino grosso dos equinos pode suprir em grande parte a necessidade energética de manutenção. Porém, para atingir a necessidade energética de cavalos em atividade física, torna-se insuficiente, tendo que ser suprida tradicionalmente com a adição de grãos e/ou subprodutos de grãos de cereais, que apresentam grandes quantidades de amido, fornecendo mais energia do que as forragens (NRC, 2007).

Os carboidratos correspondem cerca de 75% da ração na dietas de equinos, no entanto, é necessário que haja equilíbrio entre carboidratos estruturais e não estruturais, pois a ingestão de quantidades elevadas de amido na dieta do cavalo pode não ser digerido completamente no intestino delgado e atingir o ceco e cólon, causando desequilíbrio da microbiota intestinal. Essa mudança na microbiota pode ter como consequência o aumento da produção de ácido lático e queda do pH, onde causa distúrbios gastrointestinais e deixa o cavalo mais susceptível a atividades inflamatórias (MEYER, 1995). Ambos influenciados pela dieta e por outros fatores correlacionados, como consumo, manejo alimentar e qualidade da forragem, o pH e a taxa de renovação são fatores químicos e fisiológicos que atuam no desenvolvimento de microrganismos desejável em equinos (FRAPE, 2008).

Em função disso, é crescente a busca por aditivos que modulem a microbiota e pH intestinal a fim de favorecer o desempenho animal e aproveitamento dos nutrientes presentes na dieta, sendo conhecidos como probióticos ou agentes antimicrobianos. A levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* entra como alternativa de suplementos alimentares devido às propriedades antimicrobianas, inibidoras ou redutoras do crescimento de microrganismos patogênicos, associada à melhora da barreira imunológica no intestino com regulação das atividades inflamatórias.

Porém, em experimentos já realizados foi demonstrado que existe grande variação na quantidade e nas concentrações das cepas de levedura, variação na

matéria-prima, do processamento utilizado na confecção das dietas, raça, idade e a proporção concentrado: volumoso, que resultam em respostas conflitantes.

Sendo assim, estudos são necessários para determinar o nível adequado e a viabilidade do uso de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) em dietas para equinos.

2. HIPÓTESE

A suplementação de levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* aumenta a digestibilidade de nutrientes da dieta e modula o padrão fermentativo intestinal e gástrico, podendo ser associada ao concentrado.

3. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi investigar o coeficiente de digestibilidade aparente total (CDA) dos nutrientes, parâmetros de fermentação intestinal e gástrica com a suplementação de levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc 47 ($1,5 \times 10^{10}$ cfu/g) e levedura protegida *Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc 47 (1×10^{10} cfu/g) de equinos em manutenção.

3.1. Os objetivos específicos:

Avaliar o efeito da inclusão com levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* e suplementação com levedura *Saccharomyces cerevisiae* termoestável sobre:

- A digestibilidade aparente dos componentes da dieta;
- A avaliação da resposta glicêmica e insulinêmica;
- As avaliações das concentrações de colesterol, triglicérides e frações HDL, LDL e VLDL;
- O pH das fezes e conteúdo gástrico;
- A endotoxemia através do TNT- α no soro;
- Expressão gênica nas fezes;
- Análise de ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico nas fezes e conteúdo gástrico;
- Avaliação do padrão fermentativo das fezes e conteúdo gástrico por meio de ensaio de produção de gases *in vitro*;

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Características Anatômicas e Fisiológicas do Trato Digestório dos Equinos*

O trato digestório dos equinos é dividido em boca, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Cada segmento desempenha funções específicas na digestão e absorção dos nutrientes, com destaque para os intestinos delgado e grosso nesse processo (MORGADO & GALZERANO, 2009).

A digestão do equino pode ser dividida sob o ponto de vista fisiológico em região pré-cecal, constituída por estômago e intestino delgado, com predomínio de digestão enzimática e região pós-ileal, intestino grosso, com digestão microbiana (MEYER, 1995).

O estômago é relativamente pequeno, com capacidade aproximada de 15 litros, ajustado para uma recepção contínua de pequenas quantidades de alimentos. Para aumentar o tempo de permanência do alimento nesse compartimento (principalmente concentrados) é preciso evitar sobrecargas alimentares, através do fornecimento fracionado do concentrado, ou aumentar o teor de fibra nas rações concentradas. O intestino delgado tem aproximadamente 22 metros de comprimento, com capacidade aproximada de 64 litros. Nessa porção, as proteínas, gorduras e carboidratos solúveis sofrem digestão enzimática e são absorvidos. No intestino grosso a população microbiana coloniza o alimento e reduz as fibras em ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) importantes no metabolismo energético dos cavalos. Além disso, o intestino grosso tem a função de absorção de fósforo e eletrólitos e a habilidade de armazenar e absorver água (CARVALHO et al., 1992).

O intestino grosso (IG) ocupa aproximadamente 65% do trato gastrointestinal, dividido em ceco, cólon e reto. É no IG que ocorre a maior parte da fermentação microbiana e também é o local primário de digestão dos carboidratos estruturais, que são degradados por enzimas produzidas pelos microrganismos ali presentes e absorvidos na forma de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato. A forma anatômica e a motilidade do ceco e do cólon dos equinos favorece o maior tempo de retenção do alimento em relação aos outros compartimentos do trato, o que possibilita a ação dos microrganismos na digestão

dos constituintes da parede celular das forragens (HINTZ et al., 1979; MEYER, 1995).

4.2. Aspectos Gerais e alimentos para equinos

A fração volumosa da dieta é a base da nutrição equina por conter em sua composição grandes teores de fibra, indispensável para a saúde intestinal, sendo a principal fonte de nutrientes para equinos. De acordo com Frape (2008), seja qual for o feno utilizado, este deve ser composto de plantas nutritivas, não tóxicas e seguras para o consumo, além do estágio de maturidade da cultura no momento do corte e as condições de tempo e cuidado com o armazenamento serem características relevantes para a qualidade do mesmo.

Silagens de boa qualidade e pré secados podem ser utilizados na alimentação, desde que se leve em consideração alguns fatores antes do fornecimento, tais como composição, isenção de fermentação anormal e ausência de mofo (FRAPE, 2008).

A eficiência da utilização da fibra dietética pelos herbívoros está correlacionada a três fatores principais: composição da dieta (especialmente fração correspondente aos carboidratos estruturais e não estruturais); taxa de fermentação e taxa de passagem pelo trato digestório (especialmente nos compartimentos com atividade fermentativa), que está intimamente relacionada ao consumo e composição da dieta (DROGOUL et al., 2000).

Em relação aos alimentos concentrados, os cereais são as principais fontes de energia na dieta dos equinos, principalmente de animais que estão em atividade física ou trabalho intenso. Alguns dos cereais mais utilizados são: milho, aveia, trigo, sorgo, arroz e cevada. Estes são compostos por teores de amido que quando digerido libera principalmente glicose, porém, quando fornecido em grandes quantidades, pode não ser totalmente digerido pelas enzimas do intestino delgado, sendo que o amido em excesso ou resistente pode passar diretamente para o ceco e causar distúrbios digestivos (PAGAN, 1998).

Outros ingredientes considerados como coprodutos de indústrias alimentícias podem ser adicionados ao concentrado. Alguns destes são ricos em energia e muito palatáveis, como a farinha de biscoito, o melaço e a polpa de beterraba. Outros coprodutos constituem fontes de fibras solúveis e pectinas, como a polpa cítrica, casca de algodão e casca de soja. Estes últimos tem se tornado cada vez mais úteis

na alimentação dos equinos, pois podem ser adicionados nas formulações de concentrados e substituir ingredientes ricos em amido e não causar o risco de distúrbios digestivos (FRAPE, 2008).

4.3. *Carboidratos e a resposta glicêmica na dieta de equinos*

Os carboidratos estão presentes em grandes quantidades na dieta de equinos, por serem uma fonte de energia muito importante (NRC, 2007). Os equinos digerem principalmente os carboidratos não estruturais (95%), como amido, maltose e sacarose no intestino delgado. Carboidratos estruturais mais complexos (40-50%) são digeridos principalmente no intestino grosso (PAGAN, 2001). A presença de uma microbiota especializada no intestino grosso possibilita o aproveitamento dos carboidratos estruturais da parede celular das forrageiras para obtenção de energia.

As frações dos carboidratos são definidas pelos métodos químicos ou enzimáticos utilizados para a sua análise. São avaliados nas dietas em função das características anatômicas dos vegetais, com ênfase na parede celular vegetal e conteúdo celular. Sua separação se baseia nas diferenças de solubilidade e especificidade enzimática. Os carboidratos não fibrosos (CNF) abrangem os ácidos orgânicos, monossacarídeos, oligossacarídeos, frutanas, amido, substâncias pécicas, (1→3) (1→4) – β – glucanas e outros carboidratos que não a hemicelulose e a celulose. O sistema de fracionamento dos carboidratos em fibrosos e não fibrosos foi desenvolvido para uso em nutrição de ruminantes (NRC, 2007) e tem sido utilizado na avaliação de alimentos para equinos. Segundo Van Soest (1994), são classificados em estruturais, constituídos por polissacarídeos presentes na parede celular, como hemicelulose, celulose e lignina, e não estruturais formados por carboidratos simples, como amido, monossacarídeos, dissacarídeos, frutanos e pectinas.

Contudo, diferenças importantes entre espécies devem ser observadas, no que se diz respeito ao processo de digestão, em função da diferença do trato digestivo, o que implica em diferenças na digestibilidade dos alimentos (SMOLDERS et al., 1990).

Quando os carboidratos não estruturais como amido, monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos são consumidos em grandes quantidades e não são digeridos no intestino delgado, passam para o intestino grosso onde irão fermentar rapidamente e produzir excesso de gases e ácido láctico. A alta

concentração de ácido láctico retém água e reduz o pH luminal para valores inferiores a 6 o que aumenta o risco de desordens digestivas como diarreia osmótica e cólica associadas à distensão intestinal por gases e fluidos (COHEN, 1999).

Os monossacarídeos resultantes da digestão dos carboidratos são absorvidos no trato gastrointestinal do cavalo e, em seguida, conduzidos ao fígado, onde a maioria destes açúcares é convertida em glicose-6-fosfato pelos hepatócitos e armazenados no fígado e nos músculos na forma de glicogênio. A glicose remanescente é liberada para a circulação geral (JONES, 2003).

A glicemia depende do equilíbrio entre entrada da glicose sanguínea (glicose absorvida e glicose endógena), sua liberação pelo fígado e utilização pelos tecidos (FORD & EVANS, 1982). Esta utilização é regulada pela insulina no período pós prandial, hormônio produzido pelas células pancreáticas β e principalmente encontradas no tecido muscular. Em adição à insulina, outros hormônios regulatórios estão envolvidos na homeostase da glicose como o glucagon, glicocorticoides, catecolaminas e hormônios de crescimento (LACERDA NETO et al., 1998).

Em cavalos o controle da glicose e insulina pode ser diferenciado por uma série fatores, tais como o crescimento, obesidade, gestação, disfunção da pituitária, laminite e envelhecimento. Com relação ao exercício físico, a manutenção da homeostase de glicose no sangue é importante para compensar a fadiga muscular (STULL & RODIEK, 1988; RALSTON, 2002).

As respostas glicêmicas e insulinêmicas de equinos têm sido correlacionadas com o tipo de dieta oferecida ao animal, avaliando a influência dos diferentes processamentos de grãos e níveis de inclusão de amido. No entanto, existem poucas informações sobre a influência do uso de probióticos sobre tais parâmetros, correlacionando-os com os padrões de fermentação cecal.

Alimentos que contêm quantidades elevadas de carboidratos não estruturais estimulam à resposta insulinêmica, uma vez que a insulina é secretada quando as concentrações de glicose no sangue aumentam, mantendo adequados níveis glicêmicos (HINTZ et al., 1979). A quantidade de alimento e o tempo após a ingestão são importantes para avaliação de valores plasmáticos de insulina, visto que os picos de insulina plasmática podem até triplicar com o aumento do amido na dieta, quando comparado com os valores anteriores à ingestão do alimento (GLADE & BIESIK, 1985).

Aumentar a disponibilidade do amido para a digestão enzimática permite uma

melhor absorção do mesmo pelo intestino delgado, favorecendo maiores respostas glicêmicas e insulinêmicas (VERVUERT et al., 2009). Porém, ao aumentar a taxa de passagem do mesmo, assim como os níveis de inclusão na dieta, faz com que a capacidade de degradação pelo intestino delgado seja excedida, desencadeando efeitos negativos na digestibilidade pré-cecal do amido, menor resposta glicêmica e alteração na fermentação microbiana no ceco (PAGAN & HARRIS, 1999), mudanças essas que podem ser controladas com o uso dos probióticos. Em estudo realizado por Palagi (2015), a inclusão do probiótico não provocou alterações nos padrões de digestão pré-cecal de amido ou fermentação microbiana, que pudessem ser observados através da avaliação dos níveis plasmáticos de glicose e insulina.

Taran (2016) avaliando a inclusão de diferentes níveis de levedura *S. cerevisiae*, com concentração de 5×10^8 ufc/g e dieta contendo maior proporção de concentrado (70:30) houve aumento nos níveis de insulina quando feita a inclusão de 20 g/dia da levedura, sem influenciar a resposta glicêmica.

Endotoxinas são complexos de lipopolissacarídeos (LPS) com alto peso molecular e proteínas, associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas (PEIRÓ & VALADÃO, 2002).

A síndrome clínica conhecida como endotoxemia, ocorre subsequentemente às desordens gastrintestinais que causam perturbações na barreira mucosa, a qual constitui a defesa primária contra a absorção de endotoxina, podendo ser iniciada por pequenos desequilíbrios no ciclo de fermentação no cólon, facilitando a passagem de endotoxinas do lúmen intestinal para a corrente circulatória. Quando ocorre rápida replicação, lise ou morte das bactérias gram-negativas, um componente lipopolissacarídeo estrutural é liberado da membrana celular externa. Este componente estável ao calor, referido como endotoxina, tem três elementos estruturais: i) uma região externa de polissacarídeo que confere antigenicidade específica e é altamente variável; ii) uma região nuclear que consiste principalmente de monossacarídeos; e iii) um fragmento da molécula de endotoxina tóxico e altamente conservado, denominado lipídio A (porção ativa da membrana da bactéria Gram-negativa) (COLLATOS, 1995; MOORE, 1995).

Uma vez na cavidade peritoneal, a endotoxina age como um sinalizador de lesão intra-abdominal. Macrófagos peritoneais e células mesoteliais respondem rapidamente à endotoxina por meio da secreção de uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas-6 (IL-

6) (BARTON & COLLATOS, 1999). Pequenas quantidades de endotoxina que escapam para o interstício, vasos linfáticos e eventualmente na circulação sanguínea são eficazmente fagocitados pelas células de Kupffer no fígado ou são neutralizados pelos anticorpos anti-LPS naturais e lipoproteínas de alta densidade (BARTON, 2003).

Segundo Barton (2003) a enorme população residente de bactérias gram-negativas no trato intestinal equino produz um enorme reservatório de endotoxina, normalmente confinada ao lúmen do intestino saudável por barreiras protetoras da mucosa. No entanto, se a parede intestinal é danificada por isquemia, infecção, inflamação, hipoxemia (por exemplo, choque hemorrágico ou exercício extenuante), ou trauma, a endotoxina contida ganha acesso à circulação. Com a alta incidência de doenças gastrointestinais agudas em cavalos adultos, a endotoxemia é uma seqüela comum à cólica. Doses moderadas de endotoxina causam primeiramente hipertensão arterial sistêmica ("fase hiperdinâmica"), seguido por uma queda da pressão arterial ("fase hipodinâmica"). A diminuição da resistência vascular periférica, depressão miocárdica, hipovolemia e trombose microvascular contribuem para a redução do fluxo sanguíneo para os órgãos vitais, que quando mais intensos, o processo torna-se irreversível.

A liberação maciça de endotoxinas bacterianas na circulação sanguínea pode resultar na "Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica", também conhecida como choque endotóxico, em que alterações hemodinâmicas decorrentes da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular periférica, desenvolvimento de hipotensão, redução marcante do fluido intravascular e perfusão sanguínea tecidual, isquemia e hipóxia de vários órgãos, conduzem frequentemente à morte do animal (WEEREN & MUIR, 1992).

O fator desencadeante do choque endotoxêmico é um lipopolissacarídeo (LPS) de estrutura complexa, derivado da porção externa da membrana de bactérias Gram negativas, capaz de sensibilizar o organismo, induzindo à liberação sistêmica de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas tipo 1 e 6 (MIYAMOTO, 1993; CHANG et al., 1996).

A hiperglicemia é um achado frequente durante a fase inicial do quadro endotoxêmico (WEIL et al., 1988; McGUINNESS et al., 1995; WITEK-JANUSEK & YELICH, 1995) e é decorrente do incremento da glicólise e da glicogenólise, promovido pela ação de catecolaminas e hormônios hiperglicemiantes (glucagon e

hormônio do crescimento). Os mecanismos regulatórios são capazes de manter provisoriamente a pressão sanguínea, a perfusão tecidual e a glicemia, compondo o que se denomina de fase hiperdinâmica do estado de choque, de melhor prognóstico. Com a progressão da doença e a incapacidade de manutenção do tono simpático por mais tempo, ocorre vasodilatação periférica e queda de pressão arterial, com consequente redução da perfusão sanguínea tecidual e da glicemia, contribuindo para a piora clínica progressiva, resultando na fase hipodinâmica do choque, considerada a fase final da doença (LANG & DOBRESU, 1991; BREITSCHWERDT et al., 1997; MAITRA et al., 2000).

Por outro lado, descreve-se também a hipersecreção insulínica nos quadros de endotoxemia (LEIFER et al., 1985; BATTELINO et al., 1996; AGWUNOBI et al., 2000) e de acordo com YELICH & FILKINS (1982) e VIRKAMAKI & YKI-JARVINEN (1994) esta constitui-se em um dos achados mais graves e consistentes no quadro endotoxêmico, capaz de contribuir para o agravamento da hipoglicemia e piora do quadro clínico o que resulta na morte do animal.

A depleção dos estoques de glicogênio, bem como a maior utilização da via glicolítica anaeróbica para a manutenção de fonte energética-ATP, em função da hipoperfusão tecidual e da lesão mitocondrial pela ação direta das endotoxinas, nos casos de choque endotóxico, podem resultar na diminuição dos valores séricos de glicose (LANG & DOBRESU, 1991).

Não há relatos de estudos de endotoxinas com o uso de leveduras vivas para equinos.

4.4. Probióticos e microbiota intestinal

Probióticos compreendem preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidades adequadas, os quais alteram a microbiota própria das mucosas, produzem efeitos benéficos na saúde do hospedeiro. Dentre as principais características biotecnológicas desses microrganismos cita-se a inibição de espécies bacterianas patógenas e ou deteriorantes (FAO/WHO, 2006).

A primeira definição de probiótico foi apresentada a primeira vez em 1907 por Elie Metchnikoff através da observação de que o consumo de leite fermentado, por um grupo étnico específico, teria sido responsável pela maior longevidade dos mesmo, sugerindo que estes produtos modulavam a microbiota intestinal e então

auxiliariam no equilíbrio das bactérias patogênicas e não patogênicas. No entanto, o termo probiótico foi proposto pela primeira vez em 1965 por Lilley e Still Well para descrever substâncias secretadas por um organismo que favorece o crescimento de outro, sendo contrário ao antibiótico (WEESE et al., 2003). Fuller (1993) conceituou como probiótico, a suplementação microbiana viva na alimentação que beneficiam o animal hospedeiro através do equilíbrio microbiano intestinal.

O feto no útero é estéril, mas ao nascer e passar pela vagina da mãe entra em contato com microrganismos, que são adicionados rapidamente após o nascimento e assim o recém nascido adquire uma microbiota intestinal característica da sua espécie até se tornarem bactérias anaeróbias. A estabilização da microbiota no intestino ajuda o animal a resistir a infecções, particularmente do trato gastrointestinal, mas este equilíbrio pode ser influenciado pela dieta e por fatores ambientais ou externos como excesso de higiene, uso de antibióticos terapêuticos e estresse (FULLER, 1993).

Com o conhecimento dos benefícios proporcionados pelos microrganismos vivos intestinais foi intensificada a utilização de antibióticos terapêuticos como promotores de crescimento na produção animal, onde apareceu a resistência pelas bactérias e preocupação com os possíveis efeitos colaterais causados. Com isso, novas possibilidades passaram a ser estudadas e o uso dos probióticos se tornou uma excelente alternativa devido às suas propriedades, que incluem a habilidade em reduzir o uso de antibióticos, o alto índice e segurança aparente, positiva percepção pelo público como “terapia alternativa” e/ou “natural”, manutenção da microbiota intestinal e melhora das barreiras imunológicas no intestino através do balanceamento entre as atividades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (WEESE et al., 2003; CHAUCHEYRAS-DURAND & DURAND, 2010).

Os principais gêneros identificados na microbiota intestinal de animais são: *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Veillonella*, *Streptococcus* (PARKER, 1974).

Os organismos probióticos devem resistir ao trânsito gastrointestinal e a ação enzimáticas, além de apresentar propriedades com a habilidade em aderir-se à células epiteliais do intestino, colonização do trato intestinal, produção de fator antimicrobiano, inibição de patógenos entéricos, entre outros. O sucesso da adesão

destas bactérias no trato intestinal ocorre através da fixação na parede do epitélio, ou pelo crescimento mais rápido que a sua eliminação pelo peristaltismo intestinal associado ao alimento. Portanto os organismos probióticos dependem do processo de colonização, os quais lhes permitem resistir aos mecanismos antimicrobianos, tanto químicos, como físicos, que ocorrem no intestino (WEESE, 2001).

Segundo Fuller (1993), os princípios da ação dos probióticos são: - supressão da contagem viável por: produção de componentes antibacterianos, competição por nutrientes e competição por sítios de ligação; - alteração do metabolismo microbiano: aumento ou redução da atividade enzimática; - estimulação da imunidade: pelo aumento da atividade macrófaga.

De acordo com Chaucheyras-Durand & Durand (2010), os principais efeitos dos probióticos foram encontrados nos animais durante os períodos mais estressantes, como desmame, início da lactação e após mudanças de dieta composta por forragem substituída por elevada concentração de carboidratos de rápida fermentação.

Segundo Schuster et al. (2014), há quatro principais mecanismos de ação pelos quais os probióticos previnem a colonização de bactérias patogênicas no trato digestivo. Estes podem influenciar o sistema imune do hospedeiro pela presença de metabólitos de bactérias vivas ou mortas e componentes da parede celular ou DNA, que garantem a manutenção da barreira intestinal por pequenas junções, com sobrevivência de células epiteliais intestinais e crescimento e indução de IgA, além da produção de β -defensina, no qual resulta em supressão do crescimento de patógenos, e evita inflamação local e sistêmica (OELSCHLAEGGER, 2010).

Algumas cepas probióticas produzem várias substâncias que são efetivamente antimicrobianas como os ácidos láctico e acético que são produzidos em maiores quantidades do que ácido fórmico, ácidos graxos livres, amônia, peróxido de hidrogênio, diacetil, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas e outros antibióticos (SAARELA et al., 2000). Algumas cepas aderem às células epiteliais do hospedeiro e interferem na aderência de patógenos por bloqueio dos receptores ou aumento na produção de *Lactobacillus rhamnosus* GG, onde diminui a aderência de bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, e *Clostridia* na mucosa da parede intestinal. Além disso, podem inativar toxinas por mecanismos metabólicos, se ligando a elas e não biodisponibilizar para o hospedeiro (CASTAGLIUOLO et al., 1999).

Alguns autores afirmam que a adição de leveduras na dieta de equinos pode manter o equilíbrio da microbiota intestinal, além de manipular a população

microbiana no intestino grosso e melhorar a digestão dos ingredientes da dieta e o controle do ambiente intestinal, o que levaria ao maior desenvolvimento e melhor desempenho desses animais (MONTES & PUGH, 1993; WEESE, 2002).

Tosi et al. (1989) estudaram a adição de leveduras em níveis de até 300 mg/kg na dieta concentrada de potros e relataram aumento na digestibilidade da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e hemicelulose (HEM) em comparação com dietas com 200 g/kg de levedura. Whitaker et al. (1995), estudaram a adição de 150 ou 300 g/kg de levedura no concentrado de potros com 14 meses de idade e não encontraram efeitos sobre a digestibilidade da MS, PB, FDN e energia bruta (EB).

No entanto, a capacidade desses microrganismos em modificar o ambiente do trato gastrointestinal equino e sua população ainda é bastante discutida e os resultados são controversos. De acordo com Jouany et al. (2009), a adição de leveduras vivas é conhecida por aumentar a digestão das frações de fibra da dieta. Medina et al. (2002) afirmaram que existem efeitos positivos na digestão de celulose e fibra em detergente neutro, independente da dieta, também observaram em relação o perfil de fermentação e padrão microbiano no intestino grosso de cavalos, que os efeitos de interação entre o uso de *Saccharomyces cerevisiae* e a dieta estão principalmente no ceco, possivelmente devido à maior contagem de células de levedura neste local. Sugere-se que efeitos são possíveis apenas quando as células da levedura viva presentes nos ecossistemas intestinais estão viáveis.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94 mostraram benefícios na digestibilidade da fibra de celulose e hemicelulose. Outros efeitos positivos foram encontrados sobre a parede celular das plantas (fibra em detergente neutro), indicando aumento do coeficiente de digestibilidade quando a proporção de concentrado diminuiu na dieta (JULLIAND, 2006). Os resultados obtidos com a utilização destes produtos podem variar de acordo com as cepas das leveduras e as quantidades utilizadas, além da composição da dieta.

As leveduras têm sido administradas aos animais há centenas de anos seja na forma de mosto fermentado, subproduto de fábricas e destilarias ou como produtos comerciais especialmente produzidos para a alimentação animal. A produção industrial de levedura viva começou em meados do século XIX com a finalidade de produzir pão e mais tarde, durante a primeira metade do século XX se deu início ao consumo de leveduras mortas como ingrediente alimentar (AMORIM & LOPES, 2009)

Para McKinney (2004), as leveduras são microrganismos não fotossintéticos com o núcleo separado e ciclo de vida complexo. São maiores que as bactérias, normalmente esféricas e se reproduzem por brotamento. Sua função principal é a realização da fermentação alcoólica, embora sejam capazes de produzir enzimas e vitaminas. O substrato primário para as leveduras são os açúcares fermentescíveis, os quais são transformados principalmente em etanol, dióxido de carbono e biomassa quando em condições limitantes de oxigênio.

Microrganismos anaeróbios facultativos, o que significa que podem sobreviver e crescer, com ou sem oxigênio (AMORIM & LOPES, 2009). A maioria dos fungos permanece a maior parte do seu ciclo de vida como filamento, no entanto, algumas espécies como a *Saccharomyces cerevisiae* permanecem como leveduras, alternando para filamentosos somente em casos específicos, como em baixas condições de nitrogênio no ambiente. Contudo, em laboratório são fornecidas todas as condições para que ela possa continuar na forma de levedura (RAVEN et al., 2009).

Entre os principais produtos baseados em leveduras vivas estão o creme de levedo, a levedura prensada, o levedo granulado e a levedura seca viva.

O creme de levedo é comercializado na forma de suspensão de células, com variações de brilho e de cor dependendo da linhagem, processo de produção e do substrato empregado para a multiplicação. A levedura prensada consiste de blocos compactados formados por células prensadas, com variações de peso, textura e cor, mas com aroma característico de levedo. O levedo granulado também é prensado, porém na forma de pequenos grânulos com características semelhantes ao da levedura prensada em blocos (COFALEC, 2009).

No caso de leveduras secas vivas, estas consistem de células vivas que foram desidratadas para interromper o metabolismo, mas que mantém a habilidade de restaurar a atividade fermentativa após a re-hidratação. De acordo com Cofalec (2009), as formulações apresentam teores de umidades inferiores a 8% e de forma geral podem ser classificadas em levedura seca ativa (*Active Dry Yeast*) e a levedura instantânea (*Instant Yeast*).

Os fermentos de pão, cerveja e lácticos têm sido utilizados para fins alimentícios após a inativação das células pelo calor, com eliminação da atividade fermentativa (STONE, 2006). Chamadas de *leveduras encapsuladas* passam por um processo de secagem única, e resultam em uma camada de células mortas, que protege a levedura viva por dentro. A estabilidade conferida pelo revestimento de

células mortas assegura que as leveduras vivas estejam estáveis ao calor, o que torna-se um produto ideal para incorporar em alimentos granulados, concentrados e até mesmo ao processo de peletização, muito usado na confecção de concentrados para animais.

Pesquisas analisaram a influência de probiótico na alimentação equina. Medina et al. (2002) estudaram oito equinos adultos machos fistulados, alimentados com concentrado e volumoso em proporções iguais, com ou sem suplementação diária de 10 g de SC. Após as refeições foram medidas as concentrações de ácido láctico, ácidos graxos voláteis, amônia e o pH no ceco, além de coleta de amostras do conteúdo de cólon e contagem de bactérias anaeróbias, ácido láctico, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. A suplementação com *S. cerevisiae* aumentou a concentração de células vivas viáveis, no ceco e cólon para valores de $4,3 \times 10^6$ e $4,5 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente. Aparentemente a suplementação com cultura modificou o pH e as concentrações do ácido láctico e amônia. As alterações foram maiores no ceco do que no cólon e apresentaram maiores quantidades de células do probiótico. Quando a digestão do concentrado do intestino delgado tornou-se saturada, o efeito da suplementação do probiótico limitou as mudanças indesejáveis no ecossistema intestinal dos equinos.

Jouany et al. (2008) avaliaram a influência da cultura de *S. cerevisiae* na digestibilidade aparente e na taxa de passagem de cavalos alimentados com concentrado e volumoso em proporções iguais e concluíram que a suplementação com levedura melhora a digestibilidade da fibra em detergente ácido e estimula a ingestão de MS e da FDN, sem influenciar o tempo de retenção da digesta sólida. A ausência de significância na interação da dieta *versus S. cerevisiae*, ressalta a estratégia de utilizar a levedura para estimular a digestão da celulose e melhorar o estado nutricional de cavalos manejados com dietas a base de concentrado e volumoso.

Jouany et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação com levedura *S. cerevisiae* CBS 494.94 sobre a atividade das bactérias anaeróbicas totais, celulolíticas, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, com dieta de alta fibra e alto amido. Houve melhora na digestão da parede celular vegetal e síntese de proteína microbiana pelo aumento da proporção acetato: propionato, uma vez que o acetato é o principal produto da atividade fibrolítica no intestino. A estabilização do pH no ceco e cólon sugeriu aumento da metabolização do lactato pelas bactérias ou limitação da sua produção principalmente pelo *Streptococcus*, visto que a

concentração de levedura no ceco e cólon foi superior nos cavalos suplementados.

Furtado et al. (2010), usou volumosos com diferentes qualidades, avaliaram dietas na proporção 70:30 de volumoso:concentrado com ou sem suplementação de 15g/dia de leveduras *S. cerevisiae* e não encontraram diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, extrato etéreo (EE), FDN e FDA, quando considerados fenos de mesmo valor nutricional. Contudo, os autores observaram aumento no coeficiente de digestibilidade do EE para o grupo que recebeu a dieta a base de gramíneas Tifton-85 e suplementação com levedura. Esses resultados corroboram com Morgan et al. (2007) que suplementaram com 56 g/dia de levedura cavalos adultos com dietas compostas de feno de capim bermuda de alta e baixa qualidade. Os autores não observaram diferenças significativas para os coeficientes de digestibilidade aparente total de nenhum dos nutrientes avaliados

Da mesma forma, Taran et al. (2016) avaliaram a digestibilidade dos nutrientes da dieta de pôneis alimentados com baixa proporção de volumoso:concentrado e inclusão de diferentes níveis de leveduras e não observaram efeito sobre os coeficientes de digestibilidade aparente total dos constituintes da dieta. Por outro lado, Agazzi et al. (2011) encontraram aumento nos coeficientes de digestibilidade aparente total de MS, matéria orgânica (MO), FDN e FDA em éguas suplementadas com 2 g/animal/dia de *S. cerevisiae* ($4,6 \times 10^{10}$ ufc/g) em dietas com 70:30 volumoso:concentrado.

Ao estudar o efeito da suplementação (10 g/animal/dia) com levedura *S. cerevisiae* CBS 493.94 ($4,5 \times 10^9$ ufc/g), sobre a digestibilidade dos nutrientes e taxa de passagem da parede celular em éguas alimentadas com dietas de alto amido e alta fibra, Jouany et al., (2008) avaliaram os tempos de retenção da digesta em todo o trato gastrintestinal e intestino grosso para explicar mudanças observadas na digestão. Não houve interação dieta x levedura. Animais que se alimentaram com dietas de alta fibra, apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente total superiores para MS, MO e PB. A FDA apresentou maiores coeficientes de digestibilidade em ambas as dietas. Os resultados sugerem que a suplementação com *S. cerevisiae* melhora principalmente a atividade da microbiota complexa envolvida na digestão da fração de parede celular dietética.

4.5. *Digestibilidade dos Nutrientes*

A apreensão dos alimentos efetua-se com o auxílio dos lábios, língua e dentes. A duração da mastigação depende da natureza do alimento, ou seja, cavalos demoram cerca de 10 minutos para mastigar 1 kg de aveia ou ração peletizada, enquanto demoram cerca de 40 minutos para mastigar 1 kg de feno (MEYER, 1995; CARVALHO et al., 1992).

O termo digestibilidade pode ser definido como a proporção do alimento consumido que é digerida pelo animal. Tendo a quantidade consumida pelo animal, a porção que não foi recuperada nas fezes, recebe o nome de coeficiente de digestibilidade (ANDRIGUETTO et al., 1999). A digestibilidade dos alimentos é medida segundo cada espécie animal, usando técnicas distintas de campo e de laboratório.

O sistema mais utilizado para a caracterização química dos nutrientes dos alimentos é o chamado sistema de Weende. As análises mais frequentemente realizadas são para a determinação de: MS, PB, EE, fibra bruta (FB), extrato (ou extrativo) não-nitrogenado (ENN), e cinza ou matéria mineral (MM). No sistema de Weende, para a análise de fibra bruta, durante a digestão básica, ocorre solubilização parcial da lignina e da hemicelulose contidas na amostra. Um grande erro, pois essa solubilidade parcial pode fazer com que a digestibilidade do ENN, seja menor do que a da fibra bruta (SILVA & QUEIROZ, 2006)

Van Soest (1991), tentando minimizar o problema da porção fibrosa, desenvolveu uma divisão dos componentes da amostra analisada em conteúdo celular, onde fazendo uso de soluções neutras e ácidas, foi possível a separação entre conteúdo celular e parede celular, tendo maior precisão a fração fibrosa da amostra.

De acordo com Merchen (1988), o objetivo de experimentos de digestibilidade é obter de forma acurada a quantidade de alimento fornecido e a quantidade excretada em determinado período de tempo.

Vários fatores podem afetar a digestão nos equinos tais como a individualidade, composição química dos alimentos, quantidade consumida, tipo de exercício, grau de moagem dos ingredientes que compõem a dieta, processamento da matéria prima, água contida, tempo de trânsito no trato digestivo e quantidade de fibra presente na dieta (HINTZ et al., 1979).

Agazzi et al. (2011) encontraram aumento na digestibilidade dos coeficientes aparentes para MS, MO, FDN e FDA, quando suplementaram com 2 g/animal/dia de *S. cerevisiae* ($4,6 \times 10^{10}$ ufc/g) em dieta com relação 70:30 (volumoso:concentrado). Neste sentido, Moore et al. (1994), alimentando pôneis com 65% de feno de coast-cross, e suplementados com 10 g de *S. cerevisiae*, demonstraram influenciar positivamente a digestibilidade da MS, PB, FDN e FDA. Assim como Glade (2007) que concluiu que a adição de 20 g/dia de levedura para éguas em final de gestação e início de lactação, é eficaz para o aumento na digestibilidade da MS, PB, FDN e FDA.

Pombo et al. (2016) investigaram o efeito do exercício físico moderado em cavalos adultos com e sem inclusão de *S. cerevisiae* (NCYC 996) sobre a digestibilidade aparente total dos nutrientes da dieta e não foram encontradas diferenças significativas para os tratamentos suplementados ou não, apenas diferenças foram apresentadas com o início do treinamento físico. Esses resultados diferem de estudos anteriores (KIM et al., 1991; HAUSENBLASZ et al., 1993; MOORE et al., 1994; HILL; GUTSELL, 1998; MORGAN et al., 2007; AGAZZI et al., 2011) onde a adição de leveduras *S. cerevisiae* na dieta dos equinos melhora a digestão dos nutrientes. Possivelmente, os resultados divergem em função dos efeitos individuais de cada animal utilizado nos estudos, bem como as cepas e quantidades utilizadas de leveduras, tipo de dietas e qualidade dos ingredientes. Julliard (2006) afirma que o sucesso do uso de probióticos depende da cepa do microrganismo ofertado aos animais, da quantidade de suplemento oferecido, do tempo de fornecimento e da composição da dieta.

4.6. Técnicas *in vitro* de Produção de Gases

Técnicas de laboratório para avaliar alimentos desempenham uma importante função nos futuros sistemas de produção animal (KRISHNAMOORTHY et al., 2005). As técnicas de produção de gases *in vitro* foram desenvolvidas para prever a fermentação de alimentos para ruminantes. O alimento é incubado com líquido ruminal, meio e os gases produzidos são medidos como indicadores indiretos da cinética de fermentação. Quando o alimento é incubado, este primeiramente é degradado e a fração degradada pode ser fermentada e produzir gases e ácidos da fermentação ou incorporar-se à biomassa microbiana (RYMER et al., 2005). O principal objetivo da técnica de produção de gases *in vitro* é prover informação que

seja relevante na interpretação de valores nutricionais de alimentos e/ou respostas animais e/ou impactos dos animais no ambiente (KRISHNAMOORTHY et al., 2005).

Segundo BUENO et al. (2005), os sistemas de produção de gases *in vitro* proporcionam uma estimativa da digestibilidade da matéria seca e/ou da matéria orgânica, e são um indicador direto dos produtos finais produzidos, como a produção de gases, e indireta como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Tilley & Terry (1963), se basearam em dois estágios de digestão, sendo que no primeiro momento os alimentos foram fermentados em meio anaeróbico por inóculo microbiano e em seguida, por enzima digestiva em meio ácido, similar em função às encontradas no trato digestivo dos ruminantes. A técnica exigiu animais fistulados para a remoção dos inóculo e vêm sendo utilizada até o presente momento na nutrição de ruminantes, contudo, o procedimento ainda não havia sido avaliado para equinos. Inicialmente, a aplicação da técnica *in vitro* para equinos apresentou o propósito de avaliar o valor nutritivo de alimentos. Udén & Van Soest (1984) preocuparam-se em realizar uma pré digestão ácida com pepsina do substrato, que foi pré digerido *in vitro*, a fim de simular as ações das enzimas estomacais, ocorridas previamente à fermentação. Logo em seguida, o resíduo da pré digestão seria inoculado com a digesta de equinos e coelhos. Consequentemente, os dados observados foram considerados mais confiáveis. Além disso, os autores buscaram comprovar a aplicação da técnica para equinos.

A evolução da compreensão da dinâmica do processo fermentativo nos cavalos, assim como nos ruminantes, está atrelada ao desenvolvimento de modelos matemáticos, que pela falta momentânea de modelos específicos para a espécie, foram utilizados os mesmos que descreviam a fermentação ocorrida nos ruminantes. Dessa maneira, o modelo utilizado para descrever a degradação no ensaio de Udén & Van Soest (1984) foi o de Smith et al. (1972). Os parâmetros do modelo foram: parede celular potencialmente digestível (A); parede celular indigestível (B); taxa de fermentação (K , h^{-1}); e o tempo de reconhecimento de substrato (*lag-fase*). Neste mesmo ensaio, Udén & Van Soest (1984) descreveram conceitos importantes sobre a degradação efetiva, pois se a taxa de fermentação e a taxa de passagem fossem quantificadas, essas informações poderiam ser combinadas. De tal modo que, poderia estimar a degradação da fibra de acordo com a taxa de passagem.

O tempo médio de retenção da digesta *in vivo* não é equivalente ao tempo de incubação *in situ* ou *in vitro*. O ambiente *in vivo* apresenta competição entre a

passagem e a digestão dos nutrientes disponíveis, que resultará teoricamente em uma digestibilidade mais baixa, do que se fosse realizada a incubação *in vitro*.

Ainda quanto à aplicação da técnica de Tilley e Terry (1963), outros pesquisadores modificaram os procedimentos para melhor adequar aos objetivos do estudo. Como por exemplo, Miraglia et al. (1988) utilizaram apenas a segunda etapa da técnica de Tilley e Terry (1963) e, após a secagem das amostras, as mesmas foram incubadas no ceco, por um período de 24 h. Foram somados os valores dos desaparecimentos dos nutrientes *in vitro* e *in situ* e, então, foi comparada a digestibilidade dos nutrientes dos alimentos forrageiros com o observado *in vivo*. Os autores consideraram o procedimento promissor para estimar a digestibilidade da MS e MO, e observaram que a necessidade de animais fistulados seria um inconveniente para a aplicação da técnica como uma rotina.

Em outro caso, a técnica *in vitro* de Tilley e Terry (1963) foi modificada por Bush et al. (2001) a fim de avaliar o efeito associativo da inclusão de óleo sobre a digestibilidade de alimentos fibrosos. Foram utilizados dois pôneis fistulados no ceco como animais doadores de inóculo. Sendo que um animal recebeu 100 g/dia de óleo em sua dieta. Bush et al. (2001) concluíram que a inclusão 100 g/dia de óleo na dieta do animal doador de inóculo não apresentou influência sobre o desaparecimento da MS, MO ou da fibra no substrato incubado *in vitro*. Neste estudo, os autores deveriam ter utilizado maiores níveis de inclusão de óleo na dieta do animal doador, isto porque, nestes níveis o efeito de redução da ingestão de MS foi baixo. Além disso, os equinos digerem muito bem o óleo e, a quantidade fornecida não foi suficiente para escapar da digestão proximal e influenciar a digestão da fibra.

Devido à ausência de uma técnica de digestão que simulasse os processos digestivos enzimáticos e fermentativos sequencialmente, Abdouli & Ben Attia (2007) realizaram um ensaio objetivando padronizar uma técnica de digestão enzimática para equinos, seguida de um estudo de fermentação com produção de gases, utilizando fezes de equinos como fonte de inóculo. Os autores sugeriram, segundo os resultados observados do tratamento controle (sem pré digestão), que nos ensaios *in vitro* de produção de gases já realizados anteriormente com equinos e que utilizaram alimentos na sua forma original (sem pré digestão), tenham tido os valores do potencial de fermentação não adequados. Isto por que, quando realizada a pré digestão com pepsina (2h) e alfa-amilase (4h) o perfil de degradação dos

alimentos avaliados foram diferentes do controle, fato explicado pela remoção dos nutrientes solúveis através da pré digestão. Abdouli & Ben Attia (2007) concluíram que a rotina *in vitro* em dois estágios pode ser executada utilizando fezes como inóculo, todavia, devido ao pequeno número disponível de digestibilidade *in vivo* dos alimentos, faz se necessário à aplicação da técnica em diversos alimentos de digestibilidade já conhecida para cavalos.

Fisiologicamente seria conveniente e de maior aplicação na nutrição dos equinos um procedimento *in vitro* em dois estágios. Uma pré digestão ácida e básica, seguida por fermentação. A fonte de inóculo poderia ser as fezes, evitando a necessidade de animais fistulados. Os tempos destinados a cada processo digestivo teriam que ser representativos ao tempo médio de retenção da digesta em cada um dos compartimentos anatômicos. Dessa forma, os valores de digestibilidade intermediários, bem como os parâmetros dos modelos de produção de gases, poderiam ser aplicados na estimativa dos valores de digestibilidade dos nutrientes *in vivo*. São necessários mais estudos para se padronizar os tempos destinados a cada processo digestivo, desenvolver protocolos experimentais menos laboriosos e aumentar o banco de dados dos alimentos destinados ao consumo dos cavalos.

Murray et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes níveis de inclusão de levedura sobre a fermentação *in vitro* de luzerna seca em alta temperatura, incubadas com inóculo de fezes de equinos, com a hipóteses que a levedura melhoraria a digestibilidade *in vitro* da lucerna. A suplementação com a levedura diminuiu significativamente a produção de gases, coincidindo com resultados estudados por McLean et al. (1995), que relataram um aumento significativo nos valores de degradação de feno de capim como substrato com níveis menores de levedura (1,3 mg Yea-Sacc 1026), mas uma diminuição com o uso do nível mais alto de levedura no substrato. Nesse estudo, onde também foi usado polpa de beterraba como substrato, a levedura aumentou a degradação do substrato independente do nível em que ela foi testada. No entanto, tem-se sugerido que as respostas ao uso de levedura são altamente variáveis, levando em consideração que podem ser influenciadas pela composição da dieta.

Essa degradação da matéria seca apresentada nos trabalhos com uso da suplementação com levedura pode também ser um resultado do aumento da biomassa microbiana (MURRAY et al., 2012). Contudo, o efeito da *S. cerevisiae* na concentração da população microbiana do intestino grosso de cavalos é

contraditória. Medina et al. (2002), não relatou nenhum aumento nas contagens de população microbiana no ceco ou cólon de cavalos suplementados, enquanto Moore et al. (1995), encontraram aumento significativo na concentração de bactérias celulolíticas no ceco e cólon dos cavalos suplementados com *S. cerevisiae*. Nenhum dos autores relatou a digestibilidade das dietas com o uso do suplemento.

Produto finais de fermentação não foram afetados no estudo de Murray et al. (2014), porém, o pH final do líquido incubado (6,83), apresentou aumento em comparação ao controle (6,76), na qual, possa ser efeito tampão, com uso da suplementação.

4.7. Técnica de coleta de conteúdo gástrico em equinos

Alguns estudos destacaram a importância do estômago do cavalo no ecossistema gástrico na fisiologia digestiva. Kern et al. (1974) relataram que o estômago equino é um local com processos fermentativos intensos com alta concentração microbiana, ácidos orgânicos e digestão parcial do amido (ALEXANDER & DAVIES, 1963; MARTIN-ROSSET et al, 1987; DE FOMBELLE et al, 2003; VARLOUD et al, 2004).

Devido ao grande número de trabalhos sobre a composição das secreções gástricas e síndrome equina de úlcera gástrica (EGUS) (MURRAY & SCHUSSER, 1993; BAKER & GERRING, 1993a, b, c; MERRITT et al, 2003), algumas características abióticas foram amplamente estudadas. Enquanto o estudo da secreção gástrica tem sido frequentemente realizado em cavalos em jejum, a maioria das características pós-prandiais dos conteúdos gástricos permanecem desconhecidos. Isto pode estar relacionado com a dificuldade na técnica de obtenção de quantidades adequadas de conteúdo gástrico pós-prandial para análise. A fim de investigar EGUS ou fisiologia gástrica normal, procedimentos diferentes têm sido desenvolvidos para o estudo do conteúdo gástrico equinos (VARLOUD et al., 2006).

Estas técnicas foram adaptadas em cavalos em jejum ou não. O pH do conteúdo do estômago foi amplamente estudado para ser uma medida diretamente *in situ* no cavalo vivo, usando uma sonda naso-gástrica (MURRAY & SCHUSSER, 1993). Contudo, a sonda pode mover-se dentro do órgão levando a variação na validação dos dados, exigindo que a sua posição seja monitorizada por fluoroscopia (BAKER & GERRING, 1993 a,b,c) ou radiografia (SANCHEZ et al.,

1998). Para evitar esta complicação, a sonda também pode ser inserida através de uma cânula (CLARK et al., 1996, MERRITT et al., 2003) inserida cirurgicamente no estômago do cavalo (MERRITT et al., 2003).

Algumas outras medidas bioquímicas tais como as concentrações de lactato ou de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) de conteúdo gástrico só podem ser determinadas após coleta. Os três procedimentos diferentes têm sido utilizados para alcançar este em cavalos: a eutanásia, punção gástrica e aspiração do conteúdo gástrico através de um tubo naso-gástrico (NG). Eutanásia permite a recuperação total dos conteúdos gástricos e de órgãos, mas apenas autorizações de análises a um único ponto no tempo (MARTIN-ROSSET et al, 1987; DE FOMBELLE et al, 2003; VARLOUD et al., 2004).

A canulação gástrica em cavalos tem sido o método mais frequentemente utilizado para estudar as mudanças nas características do conteúdo ao longo do tempo, especialmente as secreções de ácido em animais em jejum (MERRITT et al., 2003; ORSINI et al, 1991). No entanto, as secreções gástricas são mais líquidas e menos viscosas do que a digesta gástrica. Contudo, não seria razoável esperar que a mesma técnica para a coleta de secreções líquidas seria bem sucedida para a coleta de conteúdo gástrico pós-prandial com partículas semi-sólidas (KITCHEN et al, 2000).

Em cavalos em jejum, a aspiração de secreções gástricas através da cânula pode produzir a coleta de um volume de até 710 ml em 15 minutos (MERRITT et al., 2003). Apenas Nadeau et al. (2000) relataram a coleta do conteúdo gástrico com drenagem pós-prandial de cavalos alimentados, através de uma cânula gástrica, em que 450 ml de digesta foram coletados durante um período de 11 horas pós-prandial. No entanto, a canulação gástrica é um processo invasivo, que leva a uma modificação anatômica do órgão no interior da cavidade abdominal, permitindo a amostragem da porção ventral do estômago, não sendo adequado para coletas em uma grande população de indivíduos ou de estudos de campo (VARLOUD et al., 2006).

Com tudo, uma simples metodologia foi desenvolvida (SANGIAH et al., 1988), com base no quimo aspirado através de um tubo naso-gástrico inserido através do canal de um vídeo-endoscópio. Isso permitiu a coleta de um volume limitado de secreções gástricas que varia de 5 a 50 ml de cavalos em jejum (SANGIAH et al, 1988; SOJKA et al, 1991). Embora esta técnica permita a visualização do conteúdo

gástrico e posicionamento do tubo na região desejada do estômago, o pequeno diâmetro do tubo da coleta impede a coleta de uma porção suficiente de digesta pós-prandial para as análises que foram propostas para o estudo.

Além disso, nunca foram avaliados a repetibilidade e reprodutibilidade desta técnica. Utilizando uma técnica similar, Murray e Grodinsky (1992) aspiraram fluidos gástricos através de um tubo *single-lumen* com um balão de *mercury-filled* em sua extremidade distal e emparelhado com o endoscópio para a confirmação da posição do tubo. Esses tubos são raramente usados hoje por causa do balão que poderia romper e vaziar mercúrio.

A técnica baseada na aspiração cega através de um tubo naso-gástrico foi previamente testada por Varloud et al. (2006) mas não forneceu amostras adequadas, conseguindo apenas a aspiração de pequenos volumes (< 10 ml em 20 minutos). Então, os autores com o objetivo de estudar a repetibilidade e reprodutibilidade de um novo procedimento para a coleta de digesta gástrica em equinos, baseados na intubação naso-gástrica e orientação com o uso do vídeo-gastroscópico a fim de facilitar o estudo do ecossistema microbiano no interior do estômago equino, utilizaram 6 equinos (3 fêmeas e 3 machos castrados) com idades entre 3 e 5 anos em manutenção na qual recebiam feno e concentrado peletizado.

O conteúdo gástrico de cada cavalo foi coletado em 1 dia (duas coletas consecutivas no dia) com 22 dias de intervalo. No dia da coleta, os cavalos não tiveram acesso à água durante uma hora antes da refeição da manhã. A coleta ocorreu duas horas após a primeira refeição (concentrado e feno) de acordo com o procedimento seguinte: uma hora após a refeição da manhã e antes de cada intubação, um anestésico local (Xylocaine® 20 mg/g AstraZeneca, Rueil Malmaison, França) foi aplicado sobre as narinas dos cavalos para minimizar o desconforto devido à intubação. Uma hora e cinquenta minutos depois da refeição, os cavalos foram colocados no tronco e 1 ml de cloridrato de romifidina (Sedivet®, Boehringer Ingelheim França, Paris, França) (10 mg / mL) foi administrada por via intravenosa para sedação. Dez minutos mais tarde, um tubo nasogástrico (PVC, 2.85m de comprimento, 15 mm de diâmetro interno, diâmetro externo 19 mm) previamente aquecido em água quente e revestido com óleo mineral foi inserido através da narina para o esôfago (Defline, 1999). Um vídeo-endoscópio de 3 m flexível com 10.8mm de diâmetro (Endoscopie OPTOMED, Courtaboeuf, França), previamente revestido

com óleo de silicone no seu final, foi introduzido no tubo da sonda naso-gástrica e empurrado com o tubo no estômago. Ao mesmo tempo, foi colocado ar através do canal de endoscópio com uma bomba para permitir uma melhor visualização da digesta residual no estômago. O tubo naso-gástrico foi posicionado com a sua extremidade em contato com a massa de digesta usando o vídeo-endoscópio. Uma vez que o tubo mergulhou na digesta, o vídeo-endoscópio foi retirado do tubo. Seringas foram usadas para aspirar o quimo para dentro do tubo. O tubo foi puxado para fora do estômago e do esôfago e o conteúdo gástrico recolhido para fora do tubo por pressão de ar. O procedimento foi repetido imediatamente.

A digesta recolhida foi imediatamente armazenada em frasco estéril saturado de CO₂ para análises microbianas (20 ml). Todas as amostras foram ressaturadas com CO₂ após a coleta e mantidas por cerca de 30 min a 38 °C antes da inoculação de culturas microbianas. Cerca de 10 ml foram filtrados (Blutax 100 µM) e 3 sub-amostras de conteúdo intestinal foram filtradas e imediatamente congeladas (-25 °C) para mais tarde determinação de D- e L-lactato (1 mL), amoníaco (NH₃) (3 ml) e ácidos graxos de cadeia curta [1 ml em conjunto com um conservante (0,1 ml de uma mistura de 0,05, v / v, H₃PO₄ + 0,01 g / ml de HgCl₂)]. Aproximadamente 30 ml de digesta foram imediatamente congeladas a -25 °C em caixas de plástico hermeticamente fechadas para posterior determinação de d-glicose. Pelo menos 50 ml foram reservadas para determinação de MS de acordo com o procedimento descrito para análises dos alimentos. Quando os volumes das amostras não foram suficientes para permitir que todas as análises programadas fossem realizadas, foi dada prioridade as análises na seguinte ordem: análises de microbiologia e medição de pH, lactato, ácidos graxos de cadeia curta, NH₃, concentrações de glicose e MS.

Os autores concluíram que os resultados obtidos utilizando a técnica de coleta desenvolvida, concordaram com os resultados utilizando outras técnicas. Adicionalmente, os múltiplos parâmetros medidos simultaneamente contribuíram para uma melhor compreensão do ecossistema digestivo equino. Esta experiência não só permitiu a avaliação de uma técnica inovadora e simples para coleta de conteúdo gástrico em equinos adultos, como também forneceu informações complementares sobre as características pós-prandiais. Usando a técnica de coleta, os autores acreditam que facilitará o estudo da fisiologia da digestão no estômago podendo conduzir uma melhor compreensão da digestão pré- cecal em cavalos.

O amido dietético já foi relatado por aumentar a proporção de bactérias *Lactobacillus* e bactérias que utilizam lactato no ecossistema gástrico (DE FOMBELLE et al., 2003). Isto foi associado com uma menor concentração de lactato e concentração mais elevada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sugerindo que mais lactato foi fermentada em AGCC. Em associação com pH <4, a maior produção de AGCC poderia aumentar o risco da síndrome de úlcera gástrica equina (EGUS) (NADEAU et al., 2003). No intestino grosso, um estudo relatou que a suplementação com levedura viva pode limitar a produção de lactato com o uso de dietas ricas em amido (MEDINA et al., 2002). No entanto, não há dados sobre o impacto da suplementação com levedura viva no desenvolvimento de bactérias e atividade gástrica.

Jullian et al. (2016) investigaram o efeito da suplementação (50 g /dia) com dois níveis (dose 1: $10 \cdot 10^9$ ufc/g; dose 2: $10 \cdot 10^{10}$ ufc/g) de leveduras vivas *S. cerevisiae* (Sc47) sobre o ecossistema gástrico em cavalos adultos, se alimentando com 3 g de amido/kg de peso corporal/dia e feno na proporção 70:30 (volumoso:concentrado). O pH do conteúdo gástrico não foi alterado quando os animais foram suplementados. Animais suplementados com a dose 2, tiveram menores concentrações de bactérias que utilizam lactato em relação a dose 1 e animais não suplementados. Houve uma tendência a diminuir a concentração total de bactérias anaeróbias e amilolíticas na dose 2 comparada ao grupo não suplementado, assim como foi observado uma tendência para menores concentrações de D-Lactato para animais suplementados, independente da dose, em relação aos animais não suplementados. Não houve efeito para tratamento em relação às concentrações de AGCC, porém, a interação dieta *versus* período foi significativa ($P < 0,05$), sendo que a dose 1 apresentou maiores concentrações de AGCC no primeiro período. Os autores concluíram que o trabalho é pioneiro em evidências do uso da levedura viva para obtenção de parâmetros do ecossistema gástrico, provando que o uso do probiótico pode moderar esses parâmetros em dietas para cavalos com alta concentração de amido. Sendo assim, sugeriram que futuras investigações são necessárias para saber se a levedura viva poderia ser uma estratégia para diminuir a fermentação do amido no estômago, reduzindo riscos de EGUS.

4.8. REFERENCIAS

ABDOULI, H.; BEN ATTIA, S. Evaluation of two-stage in vitro technique for estimating automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 61, n.1-4, p.113–128, 2007.

AGAZZI. A.; FERRONI. M.; FANELLI. A.; MAROCCOLO. S.; INVERNIZZI. G.; DELL'ORTO. V.; SAVOINI. G. Evaluation of the effects of live yeast supplementation on apparent digestibility of high-fiber diet in mature horses using the acid insoluble ash marker modified method. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 3. n. 1. p. 13-18. 2011.

AGWUNOBI, A.O., REID, C., MAYCOCK, P., et al. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.85, n.10, p.3770-3778, 2000.

ALEXANDER, F.; DAVIES, M.E., 1963. Production and fermentation of lactate by bacteria in the alimentary canal of the horse and pig. *J. Comp. Pathol.* 73, 1–8.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Tecnologia sobre processament o de leveduras vivas, inativas e seus derivados: conceitos básicos. *In: Anais do I Congresso Internacional sobre uso da levedura na alimentação animal*, CBNA, Campinas, p. 5-20, 2009.

ANDRIGUETTO. J. M.; PERLY. L.; MINARD. I.; GEMAEL. A.; FLEMMING. J. S.; SOUZA. G. A. de; BONA FILHO. A. *Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos*. 6. ed. São Paulo: Nobel. 1999. v. 1. 395 p.

BAKER, S.J., GERRING, E.L., 1993a. Gastric pH monitoring in healthy, suckling pony foals. *Am. J. Vet. Res.* 54, 959–964.

BAKER, S.J., GERRING, E.L., 1993b. Technique for prolonged minimally invasive monitoring of intragastric pH in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1725–1734.

BAKER, S.J., GERRING, E.L., 1993c. Effects of a single intravenously administered doses of omeprazole and ranitidine on intragastric pH and plasma gastrin concentration. *Am. J. Vet. Res.* 54, 2068–2074.

BARTON, M. H.; COLLATOS, C. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.13, p.457-464, 1999.

BARTON, M.H. Chapter 3.7-Endotoxemia, In: ROBINSON, N.E.; SAUNDERS, W.B. 7 *Current Therapy in Equine Medicine*, 5ª Edição. Saint Louis, 2003, p.104-108.

BATTELINO, T., GOTO, M., KRZISNIK, C., et al. Tissue glucose transport in suckling rats with endotoxic shock. *Shock*, v.6, n.4, p.259-262, 1996.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de Ruminantes*. 2º edição. Jaboticabal:Prol Editora Gráfica, 2011.

BREITSCHWERDT, E.B., LOAR, A.S., HRIBERNIK, T.N., et al. Hypoglycemia in four dogs with sepsis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.178, n.10, BRUSS, M.L, Lipids and ketones, In: Kaneko J.J, (Ed), *Clinical biochemistry of domestic animals*, New York: Academic Press, p.83-905, 1997.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBOA S. P.; LOUVANDINI H.; VITTI D. M. S. S.; ABDALLA A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 123–124, p. 95–105, 2005.

BUSH, J. A.; FREEMAN, D. E.; KLINE, K. H.; et al. Dietary fat supplementation effects on CAMPBELL-THOMPSON, M.L., MERRITT, A.M., 1987. Effect of ranitidine on gastric acid secretion in young male horses. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1511–1515.

CARVALHO, R.T.L.; HADDAD, C.M.; DOMINGUES, J.L. Alimentos e alimentação do cavalo. Piracicaba: Losito de Carvalho Consultores Associados, 1992. 130p.

CHANG, C.K., GATAN, M., SCHUMER, W. Efficacy of antitumor necrosis factor polyclonal antibody on phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in septic and endotoxemic rats. *Shock*, v.6, n.1, p.57-60, 1996.

CHAUCHEYRAS-DURAN, F.; DURAND, H. Probiotics in Animal Nutrition and Health. *Beneficial Microbes*, v. 1, p. 3-9, 2010.

CLARK, C.K., MERRITT, A.M., BURROW, J.A., STEIBLE, C.K., 1996. Effect of aluminium hydroxyde/magnesium hydroxyde antacid and bismuth subsalicylate on gastric pH in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1687– 1691.

COFALEC - General characteristics of dry baker's yeast. In: COFALEC – Confederation of E.U. Yeast Products. Apostila 23 p., 2009.

COHEN, N.D.; GIBBS, P.G.; WOODS, A.M. Dietary and other management factors associated with colic in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.215, p.53-60, 1999.

COLLATOS, C. Clinical conditions associate with endotoxemia. *American Association of Equine Practitioners*, v.41, p.103-106, 1995.

de FOMBELLE, A., VARLOUD, M., GOACHET, A.-G., JACOTOT, E., PHILIPPEAU, C., DROGOUL, C., JULLIAND, V., 2003. Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. *Anim. Sci.* 77, 293–304.

DROUGOUL, C; PONCET, C; TISSERLAND, J.L. Feeding ground and pelleted hay rather than chopped hay to ponies 1. Consequences for in vivo digestibility and rate of passage of digesta. *Animal Feed Science and Technology*. 2000. v.87, p.117-130.

FAO/ WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper*, 85- Rome, 2006.

FORD, E.J.H.; EVANS, J. Glucose utilization in the horse. *British Journal of Nutrition*. v.48, p.111-117, 1982.

FRAPE, D.L. Nutrição e alimentação de equinos. 3ª Edição. São Paulo: Roca, 2008. 602p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM. 9.. Nottingham. Proceedings... Nottingham: Nottingham University Press. 1993. p. 45-52.

FURTADO. C. E.; BARBOZA. E. D.; BRANDI. R. A.; RIBEIRO. L. B. Uso de levedura em equinos alimentados com dietas compostas de fenos de diferentes qualidades nutricionais. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 39. n. 10. p. 2194-2199. 2010.

GLADE, M.J.; BIESIK, L.M.. Enhanced nitrogen retention in yearling horses supplemented with yeast culture. *Journal of Animal Science*. v. 62, p.1635-1640, 1985.

GLADE. M. J. Dietary yeast culture supplementation of mares during late gestation and early digestibility of equine feeds using horse faeces as the source of microbial inoculum. *Animal Feed Science and Technology*, v. 132, p. 155-162, 2007

HAUSENBLASZ. J.; SZUCO. J.; MEZES. M. Effect of viable yeast culture. Supplementation on nutrient digestibility and feed utilization of growing cold-blooded horses.

HINTZ, H.F.; HOGUE, D.E.; WLAKER, E.F., et al. Apparent digestion in various segments of the digestive tract of ponies fed diets with varying roughage-grain ratios. *Journal of Animal Science*. v.32, p.245-248, 1979.

JONES, W.E. Glucose Clearance. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.23, n.9, p.412-413, 2003.

JOUANY, J.P.; GOBERT, J.; MEDINA, B.; BRTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or fight-starch diet. *Journal of Animal Science*. v. 86, p. 339-347, 2008.

JOUANY. J. P.; MEDINA. P.; BERTIN. G.; JULLIAND. V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *Journal Animal Science*. v. 87. p. 2844-2852. 2009.

JULLIAND, S., JULLIAND, V. MARTIN, A. Effect of live supplementation on gstric ecosystem in horses fed a high-starch diet. *European Workshop on Equine Nutrition*, 8th., 2016. Dijon, França. *Anais...* Dijon: AgroSup, 2016. 65-67

JULLIAND. V. Pre- and probiotics: potentials for equine practice. In: EUROPEAN EQUINE NUTRITION AND HEALTH CONGRESS. 3.. 2006. Merelbeke. Proceedings... Merelbeke: Ghent University. 2006. p. 17-18.

KERN, D.L.; SLYTER, L.L.; LEFFEL, E.C.; WEAVER, J.M.; OLTJEN, R.R., 1974. Ponies vs. steers: microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. *J. Anim. Sci.* 38, 559–564.

KIM. S. M.; KIM. C. M.; LEE. H.K.; PARK. W. P.; LIM. Y. J.; KIM. B. J.; CHUNG. T. Y. Evaluation of nutrients values of some feedstuffs. and the effects of yeast culture supplementation on digestibilities of nutrients and blood parameter in horse. Korean Journal of Animal Nutrition and Feedstuff. v. 15. n. 5. p. 272-280. 1991.

KITCHEN, D.L., BURROW, J.A., HEARTLESS, C.S., MERRITT, A.M., 2000. Effect of pyloric blockade and infusion of histamine or pentagastrin on gastric secretion in horses. Am. J. Vet. Res. 61, 1133–1139.

KRISHNAMOORTHY, U.; RYMER, C.; ROBINSON, P. H. The *in vitro* gas production technique: limitations and opportunities. Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, v. 123-124, n.1, p. 1-7, 2005.

LACERDA NETO, J.C.; URBINATI, E.C.; ROSA e SILVA, A.A. M.; SANTOS, G.F. Influence of nutrition on the glucose absorption and tolerance test in horses submitted to different fasting periods. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.50, n.6, p.685-690, 1998

LANG, C.H., DOBRESU, C. Sepsis-induced increases in glucose uptake by macrophage-rich tissues persist during hypoglycemia. Metabolism, v.40, n.6, p.585-593, 1991.

LEIFER, C.E., PETERSON M.E., MATUS, R.E., et al. Hypoglycemia associated with nonislet cell tumor in 13 dogs. Journal of American Veterinary Medical Association, v.186, p.53-55, 1985

MAITRA, S.R., WOJNAR, M.M., LANG, C.H. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. Shock, v.13, n.5, p.379-385, 2000.

MARTIN-ROSSET,W., DOREAU, M., THIVEND, P., 1987. Digestion de régimes à base de foin ou d'ensilage de maïs chez le cheval en croissance. Reprod. Nutr. D'évelop. 27, 291–292.

McGUINNESS, O.P., LACY, D.B., ANDERSON, J Effect of acute glucagon removal on metabolic response to infection in conscious dog. American Journal of Physiology, v.268, n.1, p.92-99, 1995.

MCLEAN, B.M.L., AFRALZADEH, A., BATES, L., MAYES, R.W., HOVELL, F.D.D., 1995. Voluntary intake, digestibility and rate of passage of a hay and a silage fed to horses and cattle. Proc. Br. Soc. Anim. Sci. 164, 164.

MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. Journal of Animal Science. v.80, p. 2600-2609, 2002.

MERCHEN, N. R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: CHURCH, D. C. (Ed.). The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988. P. 172-201.

MERRITT, A.M., SANCHEZ, L.C., BURROW, J.A., CHURCH, M., LUDZIA, S., 2003. Effect of Gastroguard and three compounded oral omeprazole preparations on 24 h intragastric pH in gastrically cannulated mature horses. *Equine Vet. J.* 35, 691–695.

MEYER, H. Alimentação de cavalos. 2ª Edição. São Paulo: Varela, 1995. 303p.

MIRAGLIA, N.; MARTIN-ROSSET, W.; TISSERAND, J. L. Mesure de la digestibilité des

MIYAMOTO, T. Changes of cytokine activities and other parameters in experimentally induced endotoxin shock in dogs. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.41, n.1, p.32, 1993.

MONTES. A. J.; PUGH. D. G. The use of probiotics in food-animal practice. *Veterinary Medicine*. v. 88. p.282-288. 1993.

MOORE, J. Introduction to endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, 1995, Lexington. (Proceedings...), Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1995, p.100-102.

MOORE. B. E.; NEWMAN. K. E.; SPRING. P.; CHANDLER. V. E. Effect of yeast culture (Yea Sacc1026) on microbial populations and digestion in the cecum and colon of the equine. *Journal Animal Science*. v. 72. p. 252. 1994.

MORGADO, E.S.; GALZERANO, L. Fibra na nutrição de animais com fermentação no intestino grosso. *REDVET. Revista eletrônica de Veterinária*, v.10, n. 7, 2009.

MORGAN, L. M.; COVERDALE, J. A.; FROETSCHER, M. A.; YOON, I, Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses, *Journal of Equine Veterinary Science*, v, 27, n, 6, p, 260-265, 2007.

MURRAY, J. A. M.; MCMULLIN, P.; HANDEL, I.; HASTIE, P. M. The effect of freezing on the fermentative activity of equine faecal inocula for use in an *in vitro* gas production technique. *Animal feed science and technology*, v. 178, n. 3, p. 175-182, 2012.

MURRAY, J.M.D.; LONGLAND, A.; MOORE-COLYER, M. *In vitro* fermentation of different ratios of high-temperature dried lucerne and sugar beet pulp incubated with an equine faecal inoculum. *Animal Feed Science and Technology*, v. 129, p. 89–98, 2006.

MURRAY, J.M.D.; MCMULLIN, P.; HANDEL, I.; HASTIE P.M. Comparison of intestinal contents from different regions of the equine gastrointestinal tract as inocula for use in an *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, v. 187, p. 98-103, 2014.

MURRAY, M.J; GRODINSKY, C., 1992, The effects of famotidine, ranitidine and Defline, C., 1999, Le sondage nasogastrique chez le cheval adulte, *Pratique Vétérinaire Equine* 31,

MURRAY, M.J., SCHUSSER, G.F., 1993. Measurement of 24-h gastric pH using an indwelling pH electrode in horses unfed, fed and treated with ranitidine. *Equine Vet. J.* 25, 417–421.

NADEAU, J.A., ANDREWS, F.M., MATHEW, A.G., ARGENZIO, R.A., BLACKFORD, J.T., SOHTELL, M., SAXTON, A.M., 2000. Evaluation of diet as a cause of gastric ulcers in horses. *Am. J. Vet. Res.* 61, 784–790.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC): Nutrient Requirements of Horses, 6ª Edição Revisada, Washington DC: National Academy of Sciences, 2007.

ORSINI, J.A., DREYFUSS, D.J., VECCHIONE, J., SPENCER, P.A., UHLMAN, R., 1991. Effects of histamine type-2 receptor antagonist (BMY-25368) on gastric secretion in horses. *Am. J. Vet. Res.* 52, 108–110.

OSCHLAEGGER T. A. Mechanisms of probiotic actions-a review. *International Journal of Medical Microbiology*. v. 300. n. 1. p. 57–62. 2010.

PAGAN, J.D. Carbohydrates in equine nutrition, In: II ADVANCE ON EQUINE NUTRITION, 2., 2001, Versailles. Proceedings... Versailles: Kentucky, USA, 2001. P. 13-28.

PAGAN, J.D. Carbohydrates in equine nutrition. In: PAGAN, J.D. Advances in equine nutrition. Kentucky, USA: Kentucky Equine Research, p.57-70, 1998.

PAGAN, J.D.; HARRIS, P.A. The effects of timing and amount of forage and grain on exercise response in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal Supplements*. v.30, p. 451-457, 1999.

PALAGI, M.A.F. Avaliação do uso de óleos essenciais e levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para equinos. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p.75, 2015.

PARKER, R.B. Probiotics, the order half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health*. v. 29, p.4-8. 1974.

PEIRÓ J.R.; VALADÃO C.A.A. Endotoxemia em equinos. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*. São Paulo, v.5, n.1, p.48-58, 2002.

POMBO, G.V., LIMA, R.C., PEREIRA, Y.S., et al. Effects of physical training and yeast supplementation on the nutrient digestibility in horses. European Workshop on Equine Nutrition, 8th, 2016. Dijon, França. *Anais...* Dijon: AgroSup, 2016. 71-74.

RALSTON, S.L. Insulin and glucose regulation. *Veterinary Clinics of North America. Equine practice*, v.18, n.2, p. 295-304, Agosto, 2002.

RAVEN. P. H.; EVERT. R. F.; EICHHORN. S. E. *Biologia vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 856 p.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; WILLIAMS, B. A.; GIVENS, D. I. *In vitro* accumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 123- 124, n. 1, p. 9-30, 2005.

SAARELA. M.; MOGENSEN. G.; FONDEN. R.; MÄTTÖ. J.; MATTILA-SANDHOLM. T. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. v. 84. n. 3. p. 197–215. 2000.

SANCHEZ, C.L., LESTER, G.D., MERRITT, A.M., 1998. Effect of ranitidine on intragastric pH in clinically normal and neonatal foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1407–1412.

SANGIAH, S., MCALLISTER, C.C., AMOUZADEH, H.R., 1988. Effect of cimetidine and ranitidine on basal gastric pH, free and total acid contents in horses. *Res. Vet. Sci.* 45, 291–295.

SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas
SCHUSTER. A.; WEESE. J. S.; GUARDABASSI. L Probiotic use in horses: what is the evidence for their clinical efficacy? *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 28. n. 6. p. 1640–1652. 2014.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.

SMITH, L.W.; GOERING, H.K.; GORDON, C.H. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. *Journal of Dairy Science* , v.55, n.8, p.1140-1147, 1972

SMOLDERS, E.A.A.; STEG, A.; HINDLE, V.A. Organic matter digestibility in horses and its prediction. *Netherlands Journal of Agriculture Science*, v.38, p.435-447, 1990.

SOJKA, J.E., WEISS, J.S., SAMUELS, M.L., GUEY-MEI, Y., 1991. Effects of the somatostatin analogue octreotide on gastric fluid pH in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1818–1821.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C, 4ª Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.88, suplemento 1, p.2-19, 2007.

STONE, C. W. (2006) Yeast Products in the Feed Industry. A Practical Guide for Feed Professionals. In: http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/formulation/articles/yeast-products-feed-industry_243.htm (consultado em 06/07/2009).

STULL, C.L.; RODIEK, A.V. Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. *The Journal of Nutrition*, v.118, n.2, p.206-213. 1988).

TARAN, F.M.P., GOBESSO, A.A.O.; GONZAGA, I.V.F.; et al. Effects of different amounts of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on apparent digestibility and faecal parameters in horses fed high-roughage and high-concentrate diets. *Livestock Science*. v.186, p.29-33, 2016.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation

kinetic of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 185-197, 1994.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two stage technique for *in vitro* digestion of forages crops. *Journal of the British Grassland Society*, Aberystwyth, v. 18, p. 104-111, 1963.

TOSI, H.; TOLEDO, L. R. A.; LEAO, J. F. S.; et al. Avaliação de diferentes fontes protéicas para equinos em crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. v. 24. n. 11. p. 1309-1312. 1989

UDÉN, P.; PARRA, R.; Van SOEST, P.J. Factors influencing reliability of the nylon bag technique. *Journal of Dairy Science*, v.57, p.622-622, 1984.

VAN SOEST, P.J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca, New York: Cornell University Press, ed.2, p.476, 1994.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.10, p.3583-3597, Outubro, 1991.

VARLOUD, M., DE FOMBELLE, A., GOACHET, A.-G., DROGOUL, C., JULLIAND, V., 2004. Partial and total apparent digestibility of dietary carbohydrates in horses as affected by the diet. *Anim. Sci.* 79, 61–72.

VARLOUD, M.; ROUSSEL, A.; BOISOT, P. A technique for the collection and the study of biochemical and microbial characteristics of postprandial gastric contents from conscious horses. *Animal Feed Science and Technology*. v.133, p.259-274, 2007.

VERVUERT, I.; VOIGT, K.; HOLLANDS, T.; CUDDEFORD, D.; COENEN, M. Effect of feeding increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in healthy horses. *The Veterinary Journal*. v. 182, p. 67-72, 2009.

VIRKAMAKI, A., YKI-JARVINEN, H. Mechanisms of insulin resistance during acute endotoxemia. *Endocrinology*, v.134, n.5, p.2072-2078, 1994.

WEEREN, F.R., MUIR, W.W. Clinical aspects of septic shock and comprehensive approaches to treatment in dogs and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.200, n.12, p.1859-1870, 1992.

WEESE, J. A. Review of probiotics: Are they OELSCHLAEGER, 2010really “Functional Foods”. *AEEP Proceedings*, v. 47, p. 27-31, 2001.

WEESE, J. A., ANDERSON, M., LOWE, A., MONTEITH, G. J. Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. *Canadian Veterinary Medical Association*, v.44, p. 299-302, 2003.

WEESE, J. S. Probiotics. prebiotics and synbiotics. *Journal Equine Veterinary Science*. v. 22. n. 8. p. 357-360. 2002.

WEIL, M.H., VON PLANTA, M., RACKOW, E.C. Acute circulatory failure (shock). In: BRAUNWALD, E. A Textbook of cardiovascular medicine. 3ed Philadelphia : Saunders, 1988. p.561-577.

WITEK-JANUSEK, L., YELICH, M.R. Role of the cortex and medulla in the young rat's glucoregulatory response to endotoxin. Shock, v.3, n.6, p.434-439, 1995.

YELICH, M.R., FILKINS, J.P. Insulin hypersecretion and potentiation of endotoxin shock in the rat Circulatory Shock, v.9, p.589-603, 1982.

5. **CAPÍTULO I – Uso da levedura viva e levedura protegida na dieta de equinos em manutenção**

*Capítulo formatado para revista “*Equine Veterinary Journal*”

5.1. RESUMO: A inclusão de levedura viva na dieta de equinos tem sido estudada pelo potencial de redução da produção de lactato no intestino grosso dentre outros benefícios. Porém, o fato de não se conhecer seu sítio de atuação despertou o interesse na utilização de produtos contendo levedura viva protegida (peletizada). As informações que se tem sobre o produto é de que essa tecnologia garante a limitação do índice de umidade e temperatura dentro do grânulo e o organismo vivo é liberado no intestino grosso. O objetivo do trabalho foi avaliar a digestibilidade aparente dos nutrientes, parâmetros fecais (pH, concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido láctico) e sanguíneos (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)) de equinos em manutenção suplementados com levedura viva e levedura protegida. O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo (4x4) balanceado com quatro animais, avaliados por quatro períodos de 22 dias cada, sendo 15 dias de adaptação à dieta, 5 dias de coleta total de fezes (CTF) e duas semanas de intervalo entre os períodos. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados pelo PROC MIXED do programa SAS. Foi utilizado $P < 0,1$ como referência de valores significativos. As dietas foram divididas em grupo controle (CTR), grupo Levedura (LEV), grupo Levedura Protegida (PROT) e grupo Levedura + Levedura Protegida (L+P). As médias dos tratamentos foram comparadas através de contrastes ortogonais (C1: CTR *versus* LEV, PROT e L + P; C2: L + P *versus* LEV e PROT; C3: LEV *versus* PROT). Não foram observados efeitos ($p > 0,1$) para o pH fecal, concentração de TNF- α , concentrações de ácido láctico e AGCC nas diferentes dietas. Foi possível observar melhora na digestibilidade aparente nas frações fibrosas quando se usou levedura viva ou protegida e melhora da digestibilidade do extrato

etéreo quando se usa levedura. O uso da suplementação com levedura viva ou levedura protegida *Saccharomyces cerevisiae*, induz mudanças na digestibilidade da fração fibrosa da dieta, sem alterar parâmetros fisiológicos.

Palavras-chave: digestão, equinos, fermentação, probióticos, *Sacharomyces cerevisiae*

5.2. INTRODUÇÃO

A adição de leveduras na dieta de equinos pode promover o equilíbrio da microbiota intestinal, manipular a população microbiana no intestino grosso com o intuito de melhorar a digestão dos ingredientes da dieta e o controle do ambiente intestinal, o que resulta em melhor desempenho desses animais (MONTES & PUGH, 1993; WEESE, 2002). No entanto, a capacidade desses microrganismos de modificar o ambiente do trato gastrointestinal equino e sua população ainda é bastante discutida e os resultados são controversos. De acordo com Jouany et al. (2009), a adição de leveduras vivas é conhecida por aumentar a digestão das frações de fibra da dieta. Medina et al. (2002) avaliaram o perfil de fermentação e o padrão microbiano no intestino grosso de cavalos e afirmaram, que existem efeitos positivos sobre a digestão de celulose e fibra em detergente neutro, independente da dieta. Além disso, os efeitos de interação entre o uso de *Saccharomyces cerevisiae* e a dieta estão principalmente no ceco, possivelmente devido à maior contagem de células de levedura neste local. Sugere-se que efeitos são possíveis apenas quando as células da levedura viva presentes nos ecossistemas intestinais estão viáveis. Os fermentos de pão, cerveja e lácticos têm sido utilizados para fins alimentícios após a inativação das células pelo calor, eliminando a atividade fermentativa (STONE, 2006). As “leveduras encapsuladas”, como são chamadas, passam por um processo de secagem única, resultando em uma camada de células mortas, protegendo a levedura viva em seu interior. A estabilidade conferida pelo revestimento de células mortas assegura que as leveduras vivas sejam estáveis ao calor, tornando-se um produto ideal para incorporar em alimentos granulados, concentrados e até mesmo ao processo de peletização, muito usado na confecção de rações para animais. No entanto, o uso de leveduras vivas protegidas ainda não foi relatado para equídeos. Com isso, o presente estudo avaliou o efeito da suplementação com levedura viva e levedura protegida sobre a digestibilidade aparente total dos nutrientes, pH, concentração de ácido lático, concentração de ácidos graxos de cadeia curta, quantificação de

microrganismos nas fezes, perfil sanguíneo e fator de necrose alfa tumoral em equinos adultos.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA, protocolo nº 6006030315).

5.3.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Saúde Digestiva e Desempenho de Equinos (LabEqui), pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo localizada na cidade de Pirassununga, São Paulo.

5.3.2. Animais

Foram utilizados oito equinos machos castrados da raça Puro Sangue Árabe (idade aproximada de 60 meses e peso corporal de 457 ± 28 kg), medicados contra endo e ectoparasitas e imunizados contra raiva, influenza, tétano e encefalomielite. Os cavalos foram alojados em baias individuais com piso de concreto coberto com cama de maravalha. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. Ao início e término de cada fase experimental, todos os animais foram monitorados com relação à higidez por meio de hemogramas mensurados por equipamento BIOCLIN.

5.3.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo 4x4 balanceado com oito animais (2 animais por tratamento), quatro dietas: Controle (CTR); Levedura Procreatin 7® (LEV); Actisaf HR Plus Sc 47® (PROT) e adição da Levedura Procreatin 7® + Actisaf HR Plus Sc 47® (L+P). Os animais foram avaliados por quatro períodos de 22 dias

cada, sendo 15 dias de adaptação à dieta, 5 dias de coleta total de fezes (CTF) e 2 semanas de intervalo entre os períodos.

5.3.4. Dietas

A dieta concentrada foi produzida na fábrica de ração pertencente à Prefeitura do Campus Fernando Costa (USP/Pirassununga). Após a mistura, os ingredientes foram peletizados a temperatura máxima de 70 °C e com pressão de 1 m³.

O consumo diário individual adotado foi de 1,75% do peso corporal (PC) para atingir as exigências de cavalos adultos em manutenção (MARTIN-ROSSET, 2012) sendo 0,75% de concentrado e 1% de feno Tifton 85 (Tabela 1). As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia (07h00min e às 16h00min). Foi utilizada cultura comercial de levedura viva *Sacchamoryces cerevisiae* Philleo Lesaffre Feed Additives, Toluca, México: levedura viva NCYC Sc 47 (1,5 x 10¹⁰ cfu/g) e levedura protegida NCYC Sc 47 (1 x 10¹⁰ cfu/g) onde todos os animais receberam o mesmo feno e os concentrados (Tabela 1) com ou não adição de levedura viva ou protegida.

Tabela 1. Composição bromatológica das dietas utilizada e ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais.

Composição bromatológica dos concentrados e feno (corrigidos para 100% de MS)							
ALIMENTOS	MS (%)	MO (%)	FDN (%)	FDA (%)	EE (%)	PB (%)	ED (Mcal/kg)
Feno	91,2	78,4	70,2	48,3	2,26	20,6	2,20
Concentrado Controle	89,0	78,1	25,0	9,3	7,3	15,0	3,55
Concentrado com Levedura Protegida	89,0	77,8	26,0	12,4	7,0	14,5	3,38
Ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais (%)							
Farelo de trigo	43,0						
Farelo de milho	43,0						
Farelo de soja	4,0						
Óleo de soja	3,5						
Núcleo equino	3,0						
Calcário	2,5						
Sal comum	1,0						

Fonte: (POMBO, G.V., 2017)

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; ED: energia digestível

Os tratamentos usados foram: dieta basal sem adição de levedura (tratamento controle- CTR); dieta basal com adição do Procreatin 7® - 15 g/animal/dia, despejado sobre o concentrado no momento do arroçoamento (tratamento levedura viva - LEV); dieta basal com adição do Actisaf HR Plus Sc 47® - 20 g/animal/dia, incluída no momento da peletização do concentrado na fábrica de ração (tratamento levedura protegida – PROT); dieta basal com Actisaf HR Plus Sc 47® - 20 g/animal/dia + Procreatin 7® - 15 g/animal/dia: concentrado peletizado com a levedura protegida + levedura viva, totalizando 35 g de levedura viva/animal/dia (tratamento L+P).

5.3.5. *Coletas de fezes*

Os animais foram mantidos em baias individuais com cama tipo maravalha, em piso de concreto durante um período de adaptação à dieta de 15 dias. Em seguida, a cama foi removida para a realização do período de coleta total de fezes por 5 dias. A cada 12 horas o total de fezes foi recolhido, pesado, homogeneizado e uma alíquota de 10% (amostras simples) alocada em sacos plásticos identificados e armazenados em freezer (-20°C). Ao final dos 5 dias de CTF, as amostras simples foram descongeladas e homogeneizadas formando as amostras compostas, encaminhadas para estufa de ventilação forçada a 65°C até peso constante. Em seguida, as amostras foram moídas em moinhos de facas tipo Willey com peneira de 1 mm, acondicionadas em recipiente próprio.

Foram calculados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE) de acordo com AOAC (2000), fibra em detergente neutro (FDN) fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de partição de fibras proposto por Van Soest et al. (1991). A análise do amido foi conduzida segundo o método enzimático descrito por Pereira & Rossi Junior (1998). Todos os alimentos fornecidos aos animais durante o experimento foram amostrados para a realização das análises químico-bromatológicas. Durante todas as fases, as sobras foram contabilizadas como forma de

controlar a ingestão da dieta. Para cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (CDN) utilizou-se a equação:

$$CDN = \frac{(\text{nutriente ingerido} - \text{nutrientes excretado})}{\text{nutriente ingerido}} \times 100$$

Para a análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico), foram coletados 10 g de fezes diretamente da ampola retal. As amostras foram diluídas em 20 mL de água destilada e, após homogeneização, o material foi filtrado em tecido poroso (dessora) e do conteúdo, 4 mL de amostra foram transferidos para tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante contendo previamente 1 mL de ácido fórmico PA grau HPLC 98-100%. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 12 minutos a 4.000 rpm e 2 mL do sobrenadante foram transferidos para microtubo Axygen® e congelados a -20°C. As concentrações de AGCC nas fezes foram medidos por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão) por meio de coluna capilar (Stabilwax®, Restek, EUA) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, utilizando o método descrito por Erwin et al. (1961), adaptado por Getachew et al. (2002). O Hélio foi utilizado como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14.500xg durante 10 minutos. O sobrenadante (800 µl) foi transferido para um frasco seco e limpo com 100 µl do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GCSolution ® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para os cálculos.

Para a análise de ácido láctico nas fezes, 2 g de fezes foi coletado no momento de defecação espontânea, acondicionados em tubos falcon de 15 mL e congelado a -20°C. A

determinação do ácido láctico foi realizada em analisador bioquímico automático da marca Randox, modelo RX Daytona (Antrium, UK), pelo método de UV enzimático, utilizando Lactato Desidrogenase (PRYCE, 1969).

A análise do pH foi realizada com fezes frescas, onde as 12h00min do segundo dia de coleta total de fezes, uma amostra foi filtrada em panos de nylon (100 µm) e o pH das fezes aferido em peagâmetro previamente calibrado (Varloud et al., 2007).

Para a quantificação dos microrganismos, amostras foram coletadas ao sexto dia de cada período. Aproximadamente 50 g de fezes foram processadas de acordo com adaptação ao protocolo para remoção de bactérias do conteúdo ruminal descrito por Valinote (2007) e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. O DNA microbiano foi extraído utilizando o kit comercial “QIAamp DNA Stool Mini Kit”. Os *primers* foram obtidos em literatura (TAJIMA et al., 2001). Foi quantificada a expressão relativa dos genes dos microrganismos fecais por Reação em Cadeia da Polimerase (q-PCR) em tempo real. As detecções das amplificações pela técnica foram realizadas no equipamento StepOne® (Applied Biosystems®) utilizando o reagente SYBR Green master mix 2 X (Applied Biosystems®). Os *primers* específicos para determinação das bactérias foram: *Fibrobacter succinogenes* (F:5'-GGTATGGGATGAGCTTGC-3', R:5'-GCCTGCCCCTGAACTATC- 3') e *Lactobacillus genus* (F:5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3', R:5'-CACCGCTACACATGGAG-3'). O total da população de bactérias foi quantificado pelo primer (F:5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3',5'-ACGTCRTCCMCACCTTCTC-3') (MAEDA et al., 2013).

5.3.6. Coletas de sangue

Para a dosagem de glicose no plasma e insulina no soro, o sangue foi coletado por meio de punção venosa na veia jugular 30 minutos antes do fornecimento da dieta, 30, 60, 90

e 150 minutos após o fornecimento da dieta, sempre ao segundo dia de CTF. Para análise de glicose plasmática foi colhido em tubos Vacutainer BD® Fluoreto de sódio. Para análise de insulina sérica, foi utilizado tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes. As amostras foram mantidas em repouso em ambiente com temperatura controlada (18°C) por aproximadamente 20 minutos e posteriormente, centrifugados por 10 minutos a 4.000 rpm (centrífuga modelo 80-2B-15ML, Centribio; 1.800xg). Após esse procedimento, o sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL de plástico, devidamente identificados e mantidos em freezers a -20°C (STULL & RODIEK, 1988), posteriormente encaminhadas para laboratório particular para serem analisadas. A concentração de insulina foi mensurada por quimioluminescência utilizando kit reagentes Acces Ultrasensitive Insulin (Beckman Coulter, ref.:33410) enquanto que a glicose foi mensurada por meio de teste enzimático colorimétrico utilizando o kit Glicose Enzimática (VIDA Biotecnologia, ref.: 100/410).

Para análise de colesterol total (CT), frações de colesterol ligadas à Lipoproteínas (de alta densidade – HDL; baixa densidade – LDL; e muito baixa densidade – VLDL) e de Triglicérides (TG) foram colhidas amostras de sangue 30 minutos antes do alimentação matutina, como sugerido por Marchello et al. (2000). As coletas foram realizadas por meio de punção venosa na veia jugular, em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante. As amostras permaneceram em descanso por aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente controlada (18°C), centrifugadas por 10 minutos (centrífuga modelo 80-2B-15ML, Centribio) a 4.000 rpm (1.800 x g) para a separação do soro, o qual foi acondicionado em microtubos de 1,5 ml e congelados a -20°C. Posteriormente, encaminhadas para laboratório particular para análises. O CT e o TG foram determinados pelo método Colorimétrico (Enzimático de Trinder) utilizando kits específicos (Colesterol Liquiform e Triglicérides Liquiform, respectivamente). A HDL e LDL foram quantificadas pelo método Colorimétrico

(Homogêneo Seletivo - Labtest Diagnóstica). VLDL foi calculado pela equação de Friedewald (1972), dividindo-se o valor de TG por 5 (SPOSITO et al. 2007).

Para determinação de TNF- α no soro, amostras de sangue foram colhidas 150 minutos após o trato da manhã. As coletas foram realizadas por meio de punção venosa na veia jugular, em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante. As amostras permaneceram em descanso por aproximadamente 30 minutos, centrifugadas por 10 minutos (centrífuga modelo 80-2B-15 ml, Centribio) a 4.000 rpm (1.800 x g) para a separação do soro o qual foi acondicionado em microtubos criogênicos de 1,5 ml e congelados a -80°C (CAMPEBELL et al., 2007; LAVOIE-LAMOREUX et al., 2010). As concentrações de TNF- α foram determinadas por teste imunoenzimático utilizando o kit comercial DuoSet ELISA Equine TNF- α (R&D Systems) seguindo as instruções do fabricante. A curva padrão foi realizada em triplicata, sendo construída utilizando “software” on-line (elisaanalysis.com) capaz de gerar uma curva de regressão com 4 parâmetros. As concentrações de TNF- α (pg mL⁻¹) das amostras de soro foram realizadas em duplicata. Tanto a curva padrão quanto as concentrações de TNF- α nas amostras foram calculadas com base nos valores médios das densidades óticas, corrigidos para o banco. As leituras foram feitas em equipamento de leitura calorimétrica de multiplacas (leitor de ELISA Thermo Scientific Multiskan EX), ajustado para 450 nm (FELTRE, 2017).

5.3.7. *Análises estatísticas*

Os dados foram analisados pelo programa “Statistical Analysis System” (SAS Institute Inc., 2010), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Hartley. Os dados de digestibilidade aparente total e ácidos graxos de cadeia curta foram submetidos à análise de variância, que separou como causas de variação o efeito fixo de tratamentos, além de efeitos aleatórios, período, quadrado, animal dentro de quadrado, bem como efeito de quadrado. As

médias dos tratamentos foram comparadas através de contrastes ortogonais (C1: CTR *versus* LEV, PROT e L + P; C2: L + P *versus* LEV e PROT; C3: LEV *versus* PROT). O nível de significância do teste utilizado foi o de 10%.

Os dados de quantificação de microrganismos, pH e ácido láctico, foram submetidos à análise de variância, onde foi utilizado o modelo misto do pacote PROC MIXED do programa “Statistical Analysis System” (SAS Institute Inc., 2010), considerando causas de variação o efeito fixo de tratamentos, além dos efeitos aleatórios, período, quadrado, animal dentro de quadrado, bem como efeito de quadrado. O nível de significância do teste utilizado foi o de 10%.

Os dados da resposta glicêmica e insulinêmica foram analisados com as mesmas causas de variação, porém para análise dessas variáveis-resposta foi adicionado o fator tempo e adotando-se estrutura de medidas repetidas no tempo referentes aos diferentes momentos de coleta (m), utilizando o procedimento MIXED do SAS. O modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento (t) momentos e interação T x M, além dos efeitos de período, quadrado e animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. Para as análises, foram testadas 15 diferentes estruturas de covariância, sendo que a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida, com base no critérios do delineamento inteiramente casualizado. O nível de significância do teste utilizado foi o de 5%.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Parâmetros fecais

As médias com os resultados dos coeficientes de digestibilidade aparente (%CDA) dos nutrientes, pH das fezes, concentração sérica de fator de necrose tumoral alfa (pg/mL^{-1}), concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido láctico (mmol/L) nas fezes de cavalos suplementados com levedura viva e levedura protegida estão apresentados na tabela 2.

Não foi observado melhora na digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas quando se usou levedura viva ou protegida.

Tabela 2. Média dos coeficientes de digestibilidade aparente (%CDA) e erro padrão da média (EPM) dos nutrientes, pH das fezes, concentração sérica de fator de necrose tumoral alta (pg/mL-1), concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico nas fezes de cavalos suplementados com levedura viva e levedura protegida.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM	Valor – P ²			
	CTR	LEV	PROT	L+P		TRAT	C1	C2	C3
CDAMS	53,47	55,27	55,49	55,25	1,3861	0,6934	0,2464	0,9386	0,9084
CDAPB	63,58	64,72	64,70	64,00	1,9840	0,9198	0,5846	0,6810	0,9917
CDAEE	78,76	80,39	80,56	77,16	1,1285	0,3138	0,1111	0,0728	0,9292
CDAFDN	40,64	45,52	43,84	45,03	1,8990	0,2583	0,0683	0,8770	0,5207
CDAFDA	34,77	39,83	38,92	42,53	2,3394	0,1838	0,0568	0,2950	0,7883
pH fezes	6,32	6,26	6,41	6,35	0,0960	0,8607	0,8717	0,8916	0,8717
TNF- α (pg/mL ⁻¹)	0,9584	1,0163	0,8991	1,0881	0,2068	0,8675	0,4973	0,5143	0,6115
Ác, Acético (mmol/L)	6,70	6,90	7,09	6,61	0,3545	0,7357	0,4559	0,3503	0,6859
Ác, Propiônico (mmol/L)	3,09	2,95	3,15	2,96	0,1415	0,6440	0,5119	0,5859	0,2901
Ác, Isobutírico (mmol/L)	0,22	0,19	0,25	0,26	0,0252	0,4565	0,2154	0,2434	0,2671
Ác, Butírico (mmol/L)	0,50	0,50	0,51	0,55	0,0290	0,4197	0,5724	0,4270	0,1776
Ác, Isovalérico (mmol/L)	-	-	-	-	-				
Ác, Valérico (mmol/L)	-	-	-	-	-				
Ácido láctico (mmol)	2,27	1,78	1,68	2,17	0,5615		0,4220		

^{ab} Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,10)

¹ CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida,

² TRAT: Efeito dos tratamentos; C1: contraste 1: controle *versus* demais tratamentos (levedura viva, levedura protegida e levedura viva + levedura protegida); C2: contraste 2: levedura viva + levedura protegida *versus* levedura viva e levedura protegida; C3: levedura viva *versus* levedura protegida,

*, Efeito a 0,10

Não foram observados efeitos (p>0,10) para pH nas fezes, concentração sérica de fator tumoral alfa, assim como nas concentrações de ácido láctico e ácidos de cadeia curta nas diferentes dietas.

5.4.2. Expressão Gênica

Os diferentes parâmetros avaliados em função da expressão gênica nas fezes, apresentaram diferenças significativas, conforme tabela 3 (P<0,10).

Tabela 3. Parâmetros fecais em função da expressão gênica nos diferentes tratamentos.

Parâmetros	CTR	LEV	PROT	L+P	EPM	P- valor
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	1,19a	0,64b	0,70b	0,64b	0,037	0,0645
pH fezes	6,23	6,27	6,29	6,29	0,0340	0,4330
Ácido láctico (mmol/L)	2,59a	1,66b	1,61b	2,18ab	0,063	0,0453
Ác, Acético (mmol/L)	6,93	6,81	7,11	6,69	0,091	0,2840
Ác, Propiônico (mmol/L)	3,28	2,88	3,17	2,97	0,036	0,0432
Ác, Isobutírico (mmol/L)	0,24	0,17	0,26	0,26	0,0073	0,2122
Ác, Butírico (mmol/L)	28,06	-9,65	154,0	-10,93	13,62	0,3837
<i>Lactobacillus genus</i>	1,66	1,21	1,21	1,01	0,08	0,6011
pH fezes	6,34	6,24	6,39	6,30	0,0120	0,1499
Ácido láctico (mmol/L)	2,21	1,79	1,69	2,21	0,0255	0,3419
Ác, Acético (mmol/L)	6,65	6,93	7,12	6,75	0,0365	0,021
Ác, Propiônico (mmol/L)	2,99	2,96	3,16	3,02	0,0127	0,0089
Ác, Isobutírico (mmol/L)	0,21	0,19	0,25	0,27	0,0003	0,6183
Ác, Butírico (mmol/L)	-8,01	1,90	143,54	6,28	5,21	0,4550

^{ab} Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,10$)

^{*}, Efeito a 0,10

CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida.

A população de *Fibrobacter succinogenes* foi influenciada pelos tratamentos ($P = 0,0645$). O tratamento controle apresentou maior concentração e menores valores foram observados nos tratamentos com levedura que não diferiram entre si. O grupo controle apresentou maiores concentrações de ácido láctico, quando aumentou a concentração de *Fibrobacter succinogenes*.

A população de *Lactobacillus genus* não foi influenciada pelos tratamentos, mas sua concentração alterou concentrações de ácido acético e propiônico.

5.4.3. Perfil Sanguíneo

Não foram encontradas diferenças para o perfil sanguíneo dos cavalos em nenhum dos tratamentos avaliados ($P > 0,05$). Não houve diferença significativa para os valores de insulina ($P = 0,1838$) e glicose entre os tratamentos ($P = 0,2241$) (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e erro padrão da média (EPM) para concentração plasmática de colesterol total (CT), fração de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL – C), fração de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL- L), fração de colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), triglicérides (TRIG), insulina e glicose nos diferentes tratamentos (LSM; n=32¹).

Variáveis ² (mg/dL)	Tratamentos ³				EPM	Valor – P ⁴			
	CTR	LEV	PROT	L+P		TRAT	C1	C2	C3
CT	86,75	87,25	85,37	84,5	1,6359	0,8623	0,5138	0,5682	0,6087
HDL – C	42,75	42,12	41,12	42,25	0,5989	0,5740	0,7957	0,5438	0,4030
LDL – C	37,62	38,95	38,15	36,15	1,5423	0,8096	0,3973	0,3608	0,7893
VLDL – C	6,37	6,17	6,10	6,10	0,1948	0,9283	0,7676	0,9285	0,8766
TRIG	31,87	30,87	30,5	30,5	0,9744	0,9283	0,7676	0,9285	0,8766
Insulina	23,69	24,04	22,63	18,84	1,3319		0,1838		
Glicose	80,21	79,43	81,61	78,84	0,6876		0,2241		

¹Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde *n* representa o número de observações utilizadas na análise estatística,

² CT: Colesterol total; HDL – C: colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade; LDL- L: colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade; VLDL- C: colesterol ligado à lipoproteína de muita baixa densidade; TRIG: triglicérides,

³ CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida,

⁴ TRAT: Efeito dos tratamentos; C1: contraste 1: controle *versus* demais tratamentos (levedura viva, levedura protegida e levedura viva + levedura protegida); C2: contraste 2: levedura viva + levedura protegida *versus* levedura viva e levedura protegida; C3: levedura viva *versus* levedura protegida; Valores de P

5.5. DISCUSSÃO

Existe na literatura considerável variação tanto nas técnicas utilizadas quanto nas concentrações de TNF- α obtidas em soro de equinos saudáveis. Os valores médios observados variam de não detectáveis (<3 pg mL⁻¹) a valores próximos a 84.000 pg mL⁻¹ (MORRIS et al., 1990; LAVOIE-LAMOREUX et al., 2010).

Gobesso et al. (2016), suplementando ou não cavalos em exercício com 15g/dia de SC, não encontraram diferenças significativas entre os grupos levedura ou controle nas concentrações séricas de endotoxinas. Morris et al. (1990), relatam que o TNF- α é um importante mediador da endotoxemia em equinos, podendo ser observado sinais de depressão, dor abdominal leve a moderada, taquicardia e febre, com leucopenia seguida de leucocitose. No presente estudo, não foi observado efeito nas concentrações dessa citocina, possivelmente porque as dietas não prejudicaram a higidez dos animais, uma vez que não apresentaram sinais clínicos citados acima, durante todo o período experimental.

De acordo com Moore-Colyer et al, (2000) e o NRC (2007) a composição e a relação volumoso e concentrado da dieta influenciam diretamente a população microbiana no intestino dos cavalos e, conseqüentemente, a produção dos AGCC. Acredita-se que, em função da dieta estar balanceada para a categoria animal, a produção de AGCC independeu do uso ou não do probiótico.

Taran et al. (2015) avaliaram a digestibilidade dos nutrientes da dieta de pôneis alimentados com baixa proporção de concentrado:volumoso com inclusão de diferentes níveis de leveduras e também não encontraram significância nos coeficientes de digestibilidade aparente da dieta. Entretanto, Agazzi et al. (2011), observaram aumento da digestibilidade aparente da MS, MO, FDN e FDA em equinos suplementos com 2g/animal/dia de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) em dietas com 70:30 volumoso:concentrado. Jouany et al. (2008) avaliaram a influência da cultura de SC na digestibilidade aparente e na taxa de passagem de cavalos alimentados com concentrado e volumoso em proporções iguais e concluíram que a suplementação com levedura melhorou a digestibilidade da fibra em detergente ácido, estimulou a ingestão de MS e da FDN, não influenciando o tempo de retenção da digesta sólida. A ausência de significância na interação da dieta *versus* SC, ressalta a estratégia de utilizar a levedura para estimular a digestão da celulose e melhorar o estado nutricional de cavalos submetidos a dietas com concentrado e volumoso.

Ao estudar o efeito da suplementação (10g/animal/dia) com levedura SC CBS 493.94 ($4,5 \times 10^9$ ufc/g), sobre a digestibilidade dos nutrientes e taxa de passagem da parede celular em éguas alimentadas com dietas alto amido e alta fibra, Jouany et al. (2008) avaliaram os tempos de retenção da digesta em todo o trato gastrointestinal e intestino grosso para explicar mudanças observadas na digestão. Não houve interação dieta x levedura. Animais que se alimentaram com dietas de alta fibra, apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente total superiores para MS, MO e PB. A FDA apresentou maiores coeficientes de

digestibilidade em ambas as dietas. Os resultados sugerem que a suplementação com SC melhora principalmente a atividade da microbiota complexa envolvida na digestão da fração de parede celular dietética.

Segundo Jouany et al. (2009), um mecanismo positivo da levedura SC é a melhora da atividade enzimática das bactérias celulolíticas, sem diretamente agir, na população microbiana. Cavalos com dietas ricas em carboidratos fermentáveis e suplementação de SC, apresentaram melhora na atividade enzimática das bactérias celulolíticas, além do aumento concentração de ácido láctico e *Lactobacillus genes*.

Assim como reportado por Taran et al. (2015), a resposta com a adição de suplementação de SC foi observada para a população de *F. succinogenes* com uso da levedura em relação ao controle. Não foram verificadas diferenças significativas no gênero para o *Lactobacillus* e para os diversos parâmetros observados. Hastie et al. (2008) relataram que o método de preservação da amostra pode afetar a quantidade de bactérias detectadas pela técnica de PCR em tempo real. Jouany et al. (2009) não observaram nenhum efeito da suplementação de *S. cerevisiae* nas concentrações de qualquer das comunidades bacterianas testadas no cólon de cavalos para ambas as dietas (alta fibra e alto teor de amido).

A atividade de SC pode estar relacionada à capacidade para resistir ao trato gastrointestinal e atingir o intestino do equino em concentrações viáveis para promover um efeito probióticos (TARAN et al., 2011). De acordo com alguns autores, a levedura viva não é capaz de colonizar o trato intestinal dos cavalos, mas é capaz de atingir o ceco e o cólon (MEDINA et al., 2002; JOUANY et al., 2009).

5.6. CONCLUSÃO

O uso da suplementação com levedura viva ou levedura viva protegida *Saccharomyces cerevisiae* não favoreceu a digestibilidade dos nutrientes da dieta e não alterou parâmetros fecais e bioquímicos de cavalos em manutenção.

5.7. REFERENCIAS

Agazzi A, Ferroni M, Fanelli A, Marocco S, Invernizzi G, Dell'orto V, Savoini G. Evaluation of the effects of live yeast supplementation on apparent digestibility of high-fiber diet in mature horses using the acid insoluble ash marker modified method. J Equine Vet Sci 2011;1:13-18

Association Of Official Analytical Chemistry (AOAC); Official methods of analysis. 17 ed. Washington, 2000.

Berchielli TT, PIRES AV, OLIVEIRA SG. Nutrição de Ruminantes. 2nd ed. Jaboticabal: Prol Editora Gráfica, 2011.

Booth JA, Miller-Auwerda PA, Rasmussen MA. The effect of a microbial supplement (Horse-Bac) containing *Lactobacillus acidophilus* on the microbial and chemical composition of the cecum in the sedentary horse [abstract]. Equine Nutrition and physiology symposium, 2001; 17 Suppl 183–185.

Campebell RC, Peiró JR, Rosa PCS, Valadão CAA, Bechara GH. Endotoxemia por liopolissacarídeo e *Escherichia coli*, em equinos: efeitos de anti-flamatórios na concentração sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Arq Bras de Med Vet Zootec. 2007; 59:4: 837-843.

Erwin ES, Marco GJ, Emery EM. Volatile fatty acid analyses pf blood and rumen fluid by gas chromatography. J Dairy Sci, 1961; 44:9: 1768-1771.

Feltre K. Produção, utilização e comercialização de dieta completa peletizada ou extrusada para equinos. 2017. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2017.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Cli Chemistry, 1972;18:499-502.

Getachew G, Makkar HPS, Becker K. Tropical browses: contentes of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. J Agri Sci, 2002;139:341-352.

Gobesso, AAO, Pombo, GV, Costa, RL, Feltre, K, Filho, LPM . Physical training effect and inclusion of yeast in the diet on the quantification of serum endotoxin, fatty acid profile and yeast quantification in faeces of horses. In: 8th European Workshop on Equine Nutrition, 2016, Dijon. Taste, Nutrition and health of the horse. Dijon: EWEN, 2016;8: 75-78.

Jouany JP, Gobert J, Medina B, Bertin G, Julliand V. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J Animal Sci*, 2008;86:339-347.

Jouany JP, Medina P, Bertin G, Julliand V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J Animal Sci*, 2009;87:2844-2852.

Lavoie-Lamoureux A, Maghni K, Lavoie JP. Optimization of a procedure to accurately detect quine TNF- α in serum samples. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010;138:118-123.

Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2013;39:81-86.

Marchello EV, Schurg WA, Marchello IA, Cuneo SP. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. *J Equine Vet Sci*, 2000;20:453-458.

Martin-Rosset W. Nutrition et alimentation des chevaux. 2 ed. Dijon, FR, Quae editor; 2012.

Medina B, Girard ID, Jacotot E, Julliand V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J Animal Sci*, 2002;80:2600-2609.

Moore-Colyer MJS, Hyslop JJ, Longland AC, Cuddeford D. Intracaecal fermentation parameters in ponies fed botanically diverse fibre-based diets. *Anim Feed Sci Technol*, 2000;84:183-197.

Morris DD, Crowe N, Moore JN. Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res*, 1990;51:1935-1940.

National Research Council (NRC); Nutrient Requirements of Horses. 6 ed. Washington DC, 2007.

Pereira JRA, Rossi JA. Manual Prático de Avaliação Nutricional dos Alimentos; Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. Piracicaba, 1998.

Pryce JD. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst*, 1969;94:1151-1152.

Schneider BH, Flatt WP. 1975, The evaluation of feeding through digestibility experiments, p, 169 Univ, Georgia Press, Athens,

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. 4ª Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.88, suplemento 1, p.2-19, 2007.

Stone CW. 2006. Yeast Products in the Feed Industry: A Practical Guide for Feed Professionals. In: http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/formulation/articles/yeast-products-feed-industry_243.htm (consultado em 13/12/2017).

Stull CL, Rodiek AV. Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. *J Nutr*, 1988;118:206-213.

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001;67:2766-2774.

Taran FMP. Avaliação do uso de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para equinos [dissertation]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP); 2011.

Taran FMP, Gobesso AAO, Gonzaga IVF. Effects of different amounts of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on apparent digestibility and faecal parameters in horses fed high-roughage and high-concentrate diets. *Livest Sci*, 2015;186:29-33.

Valinote AC. Monensina e levedura em dietas com óleo fornecidas a touros nelores em terminação [dissertation] Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP); 2007.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 1991;74:3583-3597.

Varlout M, Roussel A, Boisot P. A technique for the collection and the study of biochemical and microbial characteristics of postprandial gastric contents from conscious horses. *Anim Feed Sci Technol*, 2007;133:259-274.

Weese JS. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *J Equine Vet Sci*, 2002;22:357-360.

6. **CAPÍTULO II – Validação da técnica de coleta de conteúdo gástrico oral de equinos suplementados com levedura viva *Saccharomyces cerevisiae***

*Capítulo formatado para revista “*Equine Veterinary Journal*”

6.1. **RESUMO:** Enquanto o estudo da secreção gástrica tem sido frequentemente realizado em cavalos em jejum, a maioria das características pós-prandiais dos conteúdos gástricos permanece desconhecida. Isto pode estar relacionado com a dificuldade na técnica de obtenção de quantidades adequadas de conteúdo gástrico pós-prandial para análise. A fim de minimizar os infortúnios que a coleta gástrica pode causar ao cavalo vivo e a pouca quantidade de amostras que atualmente se consegue com as metodologias atuais, objetivou-se validar um novo procedimento de coleta de digesta gástrica, avaliando parâmetros como pH, ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O delineamento experimental utilizado foi quadrado latino duplo balanceado com oito animais e quatro dietas. O conteúdo gástrico de cada cavalo foi coletado em 1 dia com 22 dias de intervalo, após os 5 dias de coleta total de fezes (CTF), em que no dia da coleta, os cavalos tiveram acesso a dieta e água *ad libitum*. Não houve diferença significativa nos valores de pH do conteúdo gástrico entre os tratamentos ($P=0,81$). Houve aumento das concentrações de ácido acético com o uso de levedura (6,36 mmol/L). Avaliando a técnica de coleta sugerida, conclui-se que a adaptação realizada para este procedimento de coleta de digesta gástrica apresentou fácil aplicabilidade, com alta tolerância pelos equinos, além de proporcionar perfeita precisão do local de coleta a ser avaliado.

Palavras-chave: endoscopia, equino, estômago.

6.2. INTRODUÇÃO

Enquanto o estudo da secreção gástrica tem sido frequentemente realizado em cavalos em jejum, a maioria das características pós-prandiais dos conteúdos gástricos permanece desconhecido. Isto pode estar relacionado com a dificuldade na técnica de obtenção de quantidades adequadas de conteúdo gástrico pós-prandial para análise. A fim de investigar síndrome equina de úlcera gástrica (EGUS) ou fisiologia gástrica normal, procedimentos diferentes têm sido desenvolvidos para o estudo do conteúdo gástrico em equinos (VARLOUD et al., 2007), tanto para cavalos em jejum quanto alimentados.

O pH do conteúdo do estômago é um bom parâmetro para determinar local de coleta e bom funcionamento gástrico por este motivo, tem sido estudado para ser candidato a avaliação *in situ* em equinos vivos, por meio de sonda naso-gástrica (MURRAY & SCHUSSER, 1993). Contudo, a sonda pode mover-se dentro do órgão levando a variação na validação dos dados, exigindo que a sua posição seja monitorada por fluoroscopia (BAKER & GERRING, 1993a, b, c) ou radiografia (SANCHEZ et al., 1998). Para evitar esta complicação, a sonda também pode ser introduzida através de uma cânula (CLARK et al., 1996; MERRITT et al., 2003) inserida cirurgicamente no estômago do cavalo (CAMPBELL-THOMPSON & MERRITT, 1987).

Algumas outras medidas bioquímicas tais como as concentrações de lactato ou de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) do conteúdo gástrico só podem ser determinadas após coleta. Atualmente, três diferentes procedimentos têm sido utilizados para alcançar este em cavalos: a eutanásia, punção gástrica e aspiração do conteúdo gástrico através de um tubo naso-gástrico (NG). A técnica baseada na aspiração cega através de um tubo NG foi previamente testada por Varloud et al. (2007), mas não forneceu amostras adequadas, conseguindo apenas a aspiração de pequenos volumes (<10 ml em 20 minutos). Visando novos enfoques sobre locais de processos fermentativos intensivos, onde possui grande

atividade microbiana, altas concentrações de ácidos orgânicos e uma possível digestão de amido, estudos veem demonstrando a importância da avaliação da fisiologia digestiva gástrica. Apresentando diferentes resultados com variáveis técnicas, a fim de minimizar os infortúnios que a coleta gástrica pode causar ao cavalo vivo e a pouca quantidade de amostras que atualmente se consegue com as metodologias atuais, objetivou-se validar um novo procedimento de coleta de digesta gástrica, avaliando parâmetros como pH, ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta.

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA, protocolo nº 6006030315).

6.3.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Saúde Digestiva e Desempenho de Equinos (LabEqui), pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo localizada na cidade de Pirassununga, São Paulo.

6.3.2. Animais

Foram utilizados oito equinos machos castrados da raça Puro Sangue Árabe (idade aproximada 60 meses e peso corporal 457 ± 28 kg), medicados contra endo e ectoparasitas e imunizados contra raiva, influenza, tétano e encefalomielite. Os cavalos foram alojados em baias individuais com piso de concreto coberto com cama de maravalha. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. Ao início e término de cada fase experimental, todos os animais foram monitorados com relação à higidez por meio de hemogramas mensurados por equipamento BIOCLIN.

6.3.3. *Período Experimental*

O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo 4 x 4 balanceado com oito animais (2 animais por tratamento), quatro dietas (Controle [CTR]; Levedura Procreatin 7® [LEV]; Actisaf HR Plus Sc 47® [PROT] e adição da Levedura Procreatin 7® + Actisaf HR Plus Sc 47® [L+P]). Os animais foram avaliados por quatro períodos de 22 dias cada, sendo 15 dias de adaptação à dieta, 5 dias de coleta total de fezes (CTF) e 2 semanas de intervalo entre os períodos.

6.3.4. *Dietas*

A dieta concentrada foi produzida na fábrica de ração pertencente à Prefeitura do Campus Fernando Costa (USP/Pirassununga). Após a mistura, os ingredientes foram peletizados a temperatura máxima de 70 °C e com pressão de 1 m³.

O consumo diário individual adotado foi de 1,75% do peso corporal (PC) para atingir as exigências de cavalos adultos em manutenção (MARTIN-ROSSET, 2012) sendo 0,75% de concentrado e 1% de feno Tifton 85 (Tabela 1). As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia (07h00min e às 16h00min). Foi utilizada cultura comercial de levedura viva *Sacchamoryces cerevisiae* (Philleo Lesaffre Feed Additives, Toluca, México) onde todos os animais receberam o mesmo feno e os concentrados (Tabela 1) com ou não adição de levedura viva ou protegida.

Os tratamentos usados foram: dieta basal sem adição de levedura (tratamento controle- CTR); dieta basal com adição do Procreatin 7® - 15 g/animal/dia, despejado sobre o concentrado no momento do arrojamento (tratamento levedura viva - LEV); dieta basal com adição do Actisaf HR Plus Sc 47® - 20 g/animal/dia, incluída no momento da peletização do concentrado na fábrica de ração (tratamento levedura protegida – PROT); dieta basal com Actisaf HR Plus Sc 47® - 20 g/animal/dia + Procreatin 7® - 15 g/animal/dia: concentrado

peletizado com a levedura protegida + levedura viva, totalizando 35 g de levedura viva/animal/dia (tratamento L+P).

Tabela 5. Composição bromatológica (%) das dietas utilizada e ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais.

Composição bromatológica dos concentrados e feno (corrigidos para 100% de MS)							
ALIMENTOS	MS (%)	MO (%)	FDN (%)	FDA (%)	EE (%)	PB (%)	ED (Mcal/kg)
Feno	91,2	78,4	70,2	48,3	2,26	20,6	2,20
Concentrado Controle	89,0	78,1	25,0	9,3	7,3	15,0	3,55
Concentrado com Levedura Protegida	89,0	77,8	26,0	12,4	7,0	14,5	3,38
Ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais (%)							
Farelo de trigo	43,0						
Farelo de milho	43,0						
Farelo de soja	4,0						
Óleo de soja	3,5						
Núcleo equino	3,0						
Calcário	2,5						
Sal comum	1,0						

Fonte: (POMBO, G.V., 2017)

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; ED: energia digestível.

6.3.5. Coletas do conteúdo gástrico

O conteúdo gástrico de cada cavalo foi coletado em 1 dia com 22 dias de intervalo, após os 5 dias de coleta total de fezes (CTF), em que no dia da coleta, os cavalos tiveram acesso à água *ad libitum*.

A coleta ocorreu segundo metodologia adaptada de Varloud et al. (2007), após duas horas da primeira refeição (concentrado e feno). Uma hora e cinquenta minutos depois da refeição, os cavalos foram colocados no tronco e foi administrada por via intravenosa detomidina (Detomidin®, Syntec, Votuparim, Brasil) na dose de 0,02 mg/kg para sedação. Dez minutos mais tarde, uma sonda naso-gástrica (PVC, 2.85m de comprimento, 15 mm de diâmetro interno, diâmetro externo 19 mm) previamente aquecido em água quente e lubrificado com gel foi inserida através de uma das narinas para o esôfago (Delfine, 1999). Um video-endoscópio de 3 m flexível com 10.8mm de diâmetro, previamente lubrificado com

gel no seu final, foi introduzido na narina contralateral e empurrado juntamente com a sonda para o estômago. A sonda naso-gástrica foi posicionada com a sua extremidade em contato com a massa de digesta visualizada por meio do vídeo-endoscópio, na região do corpo do estômago próximo ao *marcus plicatus*. Uma vez que a sonda mergulhou na digesta e confirmada pela imagem através do vídeo-endoscópio determinou-se o local adequado de coleta, uma bomba á vácuo foi usada para aspirar o quimo para dentro da sonda e para um recipiente de vidro.

As amostras do conteúdo gástrico foram imediatamente distribuídas em seus respectivos recipientes para posterior análises de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta. O pH do conteúdo foi aferido por peagâmetro de bancada digital (Quimis®) no momento da coleta e uma segunda aferição foi feita alguns segundos após distribuição do conteúdo em seus devidos recipientes para posterior demais análises, para verificação de uma possível modificação das amostras para estudos futuros de microbiologia

6.3.6. *Concentração de ácido graxos de cadeia curta*

Para a análise de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) do conteúdo gástrico, imediatamente após a coleta do material, 4 ml de amostra foram transferidos para tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante, contendo previamente 1 mL de ácido fórmico PA grau HPLC 98-100%. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 12 minutos a 4.000 rpm e 2 mL do sobrenadante foram transferidos para microtubo Axygen® e congelados a -20°C. As concentrações de AGCC nas fezes foram medidos por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão) por meio de coluna capilar (Stabilwax ®, Restek, EUA) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, utilizando o método descrito por Erwin et al. (1961), adaptado por Getachew et al. (2002). O Hélio será utilizado como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. As amostras foram descongeladas a

temperatura ambiente e centrifugadas a 14.500xg durante 10 minutos. O sobrenadante (800 µl) foi transferido para um frasco seco e limpo com 100 µl do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GCSolution® (Shimadzu, Japão) será utilizado para os cálculos.

6.3.7. *Concentração de ácido láctico*

Para a análise de ácido láctico, 10 mL de conteúdo foi coletado imediatamente após coleta e acondicionados em tubos de ensaio com tampa de borracha previamente pesados e congelado a -20°C. A determinação da concentração do ácido láctico foi realizada em analisador bioquímico automático da marca Randox, modelo RX Daytona (Antrium, UK), pelo método de UV enzimático, utilizando Lactato Desidrogenase.

6.3.8. *Análises estatísticas*

Os dados foram analisados pelo programa “Statistical Analysis System” (SAS Institute Inc., 2010), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Hartley. Os dados de ácido láctico e pH foram submetidos à análise de variância, que separou como causas de variação o efeito fixo de tratamento, efeito de período, quadrado, efeito de animal dentro de quadrado. As médias dos resultados de AGCC foram comparadas através de contrastes ortogonais (C1: CTR *versus* LEV, PROT e L + P; C2: L + P *versus* LEV e PROT; C3: LEV *versus* PROT. O nível de significância do teste utilizado foi o de 5%.

6.4. RESULTADOS

Não houve diferença significativa nos valores de pH do conteúdo gástrico entre os tratamentos (P=0,81). O pH do conteúdo retirado nos diferentes tratamentos, apresentaram médias: 6,2; 6,4; 6,1 e 6,3 para grupo CTR; LEV; PROT e L+P.

As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) estão apresentados na Tabela 5. Ao avaliar os AGCC no conteúdo do estômago, foi possível observar aumento das concentrações de ácido acético com o uso de levedura. Sendo o grupo controle a menor concentração (3,15 mmol/L), grupo levedura (4,37 mmol/L) e grupo protegido (5,43 mmol/L) sem diferenças entre elas e grupo adição levedura x protegida com a maior concentração (6,02 mmol/L).

Tabela 6. Médias e erro padrão da média (EPM) das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo gástrico nos diferentes tratamentos (LSM; n=321).

Variáveis (mmol/L)	Tratamentos ¹				EPM	Valor – P ²			
	CTR	LEV	PROT	L+P		TRAT	C1	C2	C3
Ác, Acético	3,15	4,37	5,27	6,36	0,3538	0,0082	0,0062	0,044	0,2899
Ác, Propiônico	1,59	1,55	1,60	1,66	0,0546	0,8712	0,4831	0,4904	0,7013
Ác, Isobutírico	-	-	-	-					
Ác, Butírico	-	-	-	-					
Ác, Isovalérico	-	-	-	-					
Ác, Valérico	-	-	-	-					
Ácido Lático	0,30	0,90	0,73	0,22	0,6029			0,5953	
pH	6,2	6,4	6,1	6,3	0,2409			0,8420	

(-) Valores não detectáveis,

^{ab} Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05)

¹ CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida,

² TRAT: Efeito dos tratamentos; C1: contraste 1: controle *versus* demais tratamentos (levedura viva, levedura protegida e levedura viva + levedura protegida); C2: contraste 2: levedura viva + levedura protegida *versus* levedura viva e levedura protegida; C3: levedura viva *versus* levedura protegida.

Os valores da concentração de ácido láctico total no conteúdo gástrico foram de 0,30 mmol para grupo CTR; 0,90 mmol para grupo LEV; 0,73 mmol para grupo PROT e 0,22 mmol para grupo L+P. Não houve diferença para concentração desse ácido no conteúdo estomacal (P=0,5953).

6.5. DISCUSSÃO

O uso desta técnica é, no entanto, complicado pelo potencial efeito estimulador do tubo NG e pelo possível efeito da sedação no esvaziamento gástrico. Para diminuir o risco aos cavalos e aos pesquisadores, todos os animais foram sedados com Detomidina, para que o impacto fosse menor ao esvaziamento gástrico. A medida que a intubação NG foi

emparelhada com o video-gastrosκόpio, foram necessárias cinco pessoas competentes e treinadas para cada sessão de amostragem. Uma pessoa foi responsável pela restrição da cabeça do cavalo, uma pessoa estava responsável pela coleta do material e três pessoas estavam encarregadas da orientação e do posicionamento adequado do endoscópio e da sonda para aspiração e coleta do quimo.

Segundo Varloud et al. (2007), que fizeram coletas de conteúdo com sonda nasogástrica e vídeo-gastrosκόpio não simultaneamente, em contraste com a aspiração cega pós-prandial, o uso do endoscópio permitiu um melhor controle do tubo NG e boa aspiração das coletas. Sendo que o tempo gasto para coleta de conteúdo gástrico foi minimizado.

Contrário a técnica que utilizava apenas uma cânula gástrica que permitia a amostragem apenas da parte ventral do estômago, o uso do endoscópio permitiu a seleção da área de coleta no estômago. No presente estudo, foi possível observar as diferentes digestas entre os animais. Algumas mais líquidas, provavelmente entre os animais que ingeriram mais água após alimentação, outras mais sólidas com mais feno ou mais concentrado. Vez mais sólida viscosa, vezes mais líquida. Apesar da viscosidade do quimo durante algumas coletas, grande volume de quimo foi coletado ($\pm 300\text{-}500\text{ mL}$).

Segundo Frape (2008), os carboidratos são fermentados a ácido láctico e o pH da digesta diminui para aproximadamente 2,6 no estômago. No estudo de Varloud et al. (2007), os valores de pH no conteúdo gástrico de cavalos com o mesmo tempo de alimentação, foi de 5,23 na primeira medição e de 5,08 na segunda. Os autores não conseguiram ter precisão do local de coleta e possivelmente as amostras foram colhidas abaixo da linha do *marcus plicatus*, onde alguns estudos acreditam que ocorram o início da digestão de amido e intensa atividade microbiana. Fica claro que o procedimento e as condições de manuseio permitiram a conservação satisfatória das amostras recolhidas e que os tratamentos não interferem no pH do estômago.

Nadeau et al. (2003), estudaram os motivos das úlceras gástricas através da comparação da lesão na mucosa gástrica não glandular, causada pelo ácido clorídrico (HCl) ou por ácidos graxos de cadeia curta de cavalos alimentados com feno ou feno e grãos e perceberam que o ácido acético foi encontrado na maior concentração, seguido dos ácidos butírico e propiônico. Além disso, um estudo realizado pelo mesmo grupo, revelou que o pH do conteúdo estomacal e as concentrações de AGCC são fatores importantes e que contribuem para a gravidade das úlceras gástricas em cavalos .

Os resultados do ácido acético no conteúdo estomacal apresentaram valores maiores quando comparados aos da literatura. Segundo Varloud et al. (2007) dietas enriquecidas com amido levam a um aumento de bactérias anaeróbias, especialmente *Lactobacillus spp.*, o que, por sua vez, resulta em um aumento da produção de ácido láctico e AGCC no estômago. Como durante a presente pesquisa, foram realizadas análises da digestibilidade da dieta e não foi encontrada diferenças significativas em relação ao uso ou não do probiótico, entende-se que o aumento das concentrações de ácido acético no estômago, talvez signifique digestão inicial de fibras e que o uso da levedura viva e da levedura protegida provavelmente auxiliaram o aumento de bactérias gram-negativas, sem interferir nos valores de pH, o que pode influenciar no padrão fermentativo nesse primeiro compartimento do trato gastrointestinal.

Al Jassim et al. (2009), avaliaram concentração de ácido láctico nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal de equinos para monitoramento de acidose láctica e lamite e apresentaram valores entre 2-3,5 mmol no ceco e reto e desde valores não detectável á 4,3 mmol no estômago. Julliand et al. (2017), mensuraram concentração de ácido láctico no estômago com diferentes dietas a base de forragem e encontraram valores variando de 0,75 a 1,51 mmol. Valores próximos aos encontrados no presente estudo.

6.6. CONCLUSÃO

Avaliando a técnica de coleta sugerida, independente das dietas ofertadas aos animais, foi possível realizar o procedimento com uso de animais vivos, com pouco ou nenhum desconforto aos cavalos, usar maior número de animais e possibilitou a coleta de material para avaliação de diferentes parâmetros fisiológicos. Conclui-se que a adaptação realizada para este procedimento de coleta de digesta gástrica apresentou fácil aplicabilidade, com alta tolerância pelos equinos, além de proporcionar perfeita precisão do local de coleta a ser avaliado.

A levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* aumentou a concentração de ácido acético na porção oral do quimo no estômago de equinos.

6.7. REFERENCIAS

- Al Jassim RAM, Andrews FM. The Bacterial Community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Vet Clin Equine*, 2009; 25:199-215
- Baker SJ, Gerring EL. Gastric ph monitoring in healthy, suckling pony foals. *Am. J. Vet. Res*, 1993a; 54:959–964.
- Baker SJ, Gerring EL. Technique for prolonged minimally invasive monitoring of intragastric ph in ponies. *Am. J. Vet. Res*, 1993b; 54:1725–1734.
- Baker SJ, Gerring EL. Effects of a single intravenously administered doses of omeprazole and ranitidine on intragastric ph and plasma gastrin concentration. *Am. J. Vet. Res*, 1993c; 54:2068–2074.
- Campbell-Thompson ML, Merritt AM. Gastroduodenal ulceration in foals. In: *Annual Convention of the AAEP*, 1987; 29-40.
- Clark CK, Merritt AM, Burrow JA, Steible CK. Effect of aluminium hydroxyde/magnesium hydroxyde antacid and bismuth subsalicylate on gastric ph in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996; 208:1687– 1691.
- Delfine C. Le sondage nasogastrique chez le cheval adulte. *Equine Vet J*, 1999; 31:285- 290.
- Erwin ES, Marco GJ, Emery EM. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J Dairy Sci*, 1961; 44:1768-1771.
- Frape DL. *Nutrição e alimentação de equinos*. 3th ed. São Paulo: Roca, 2008.

Getachew G, Makkar HPS, Becker K. Tropical browses: Contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. J Agri Sci, 2002;139:341-352.

Julliand S, Martin A, Julliand V. Effect of dehydrated alfalfa on equine gastric and faecal microbial ecosystems. Livest Sci, 2017.

Martin-Rosset W. Nutrition et alimentation des chevaux. França: Quae, 2012.

Merritt AM, Sanchez LC, Burrow JA, Church M, Ludzia S. Effect of gastrogard and three compounded oral omeprazole preparations on 24 h intragastric ph in gastrically cannulated mature horses. Equine Vet. J, 2003; 35:691–695.

Murray MJ, Schusser GF. Measurement of 24-h gastric ph using an indwelling ph electrode in horses unfed, fed and treated with ranitidine. Equine Vet. J, 1993; 25:417–421.

Nadeau JA, Andrews FM, Patton CS, Argenzio RA, Mathew AG, Saxton AM. Effects of hydrochloric, valeric, and other volatile fatty acids on pathogenesis of ulcers in the nonglandular portion of the stomach of horses. Am. J. Vet. Res, 2003; 64:413–417.

National Research Council (NRC): Nutrient Requirements Of Horses, 6th ed. Washington DC: National Academy Of Sciences, 2007.

Sanchez CL, Lester GD, Merritt, AM. Effect of ranitidine on intragastric ph in clinically normal and neonatal foals. J. Am. Vet. Med. Assoc, 1998; 212:1407–1412.

Varlourd M, Roussel A, Boisot P. A technique for the collection and the study of biochemical and microbial characteristics of postprandial gastric contents from conscious horses. Anim Feed Sci Technol, 2007; 133: 259-274.

7. CAPÍTULO III- Degradação e produção de gases *in vitro* com diferentes inóculos na dieta de equinos suplementados com levedura viva e levedura protegida

*Capítulo formatado para revista “*Journal of Animal Science*”

7.1. RESUMO: O inóculo é a principal fonte de variação dos perfis de produção de gases, sendo que a atividade fermentativa do inóculo pode sofrer alterações devido a vários fatores como o tempo de amostragem, armazenamento, animal doador e sua dieta, à sua concentração, à sua preparação, entre outros. Visando novos enfoques sobre locais de processos fermentativos intensivos, onde possui grande atividade microbiana, altas concentrações de ácidos orgânicos e uma possível digestão de amido, estudos veem demonstrando a importância da avaliação da fisiologia digestiva gástrica. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a degradação e produção de gases *in vitro* utilizando equinos suplementados com levedura viva e levedura protegida (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc 47) como doadores de inóculos fecais e de conteúdo gástrico para o processo fermentativo *in vitro*. O delineamento experimental utilizado foi quadrado latino duplo balanceado com oito animais e quatro dietas. O conteúdo gástrico de cada cavalo foi coletado em 1 dia com 22 dias de intervalo, após os 5 dias de coleta total de fezes (CTF), em que no dia da coleta, os cavalos tiveram acesso à água *ad libitum*. Foi utilizado no ensaio a técnica semi-automática de produção de gases, sendo que o inóculo utilizado foram as fezes sob o efeito dos tratamentos controle; levedura viva; levedura protegida e levedura viva + levedura protegida e outro ensaio com conteúdo gástrico. A taxa de produção de gás por hora (c) foi maior no grupo levedura viva do que no grupo levedura protegida. Não foi observado efeito para a degradabilidade da matéria seca e para a fibra em detergente neutro. O grupo L+P, tiveram maiores taxa de PG sendo o controle e a protegida, menores taxas.

Palavras-chave: conteúdo gástrico, fermentação, probióticos

7.1. INTRODUÇÃO

As técnicas de produção de gases (PG) *in vitro* foram desenvolvidas para prever a fermentação de alimentos para ruminantes. O alimento é incubado com inóculo, meio e os gases produzidos são medidos como indicadores indiretos da cinética de fermentação. A técnica de PG permite avaliar a taxa e a extensão da degradação dos alimentos, sendo este último importante para o cavalo devido ao tempo de trânsito total mais rápido do trato em cavalos em comparação com os ruminantes (McLEAN et al., 1995; DROGOUL et al., 2001). O inóculo é a principal fonte de variação dos perfis de produção de gases, sendo que a atividade fermentativa do inóculo pode sofrer alterações devido a vários fatores como o tempo de amostragem, armazenamento, animal doador e sua dieta, à sua concentração, à sua preparação, entre outros (DESROUSSEAUX et al., 2012).

A obtenção de líquido cecal ou ruminal requer intervenções cirúrgicas ou eutanásia. Com isso, a maior parte dos estudos envolvendo PG em animais com fermentação pós-gástrica, apresentaram o uso das fezes como uma alternativa. A maioria dos microrganismos no trato digestivo dos mamíferos não está aderida ao trato gastrointestinal (TGI) por si mesmo, mas vai aderindo as partículas de alimentos que passam pelo trato ou permanecem suspensas na digesta. Assim, os microrganismos intestinais que estão intimamente associados as partículas fibrosas no TGI também são excretados nas fezes. O material fecal permanece largamente anaeróbio após a defecação e, portanto, os microrganismos podem permanecer viáveis por várias horas após a excreção do aparelho digestivo (HOLTER, 1991).

Visando novos enfoques sobre locais de processos fermentativos intensivos, onde possui grande atividade microbiana, altas concentrações de ácidos orgânicos e uma possível digestão de amido, estudos veem demonstrando a importância da avaliação da fisiologia digestiva gástrica. Embora existam pesquisas consideráveis sobre o uso de fezes de ruminantes e equinos como alternativa para inóculo, poucos trabalhos apresentam resultados

com o uso de fluidos de diferentes regiões fermentativas do TGI de equinos como inóculo. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a degradação e produção de gases *in vitro* utilizando equinos suplementados com levedura viva e levedura protegida (*saccharomyces cerevisae* NCYC Sc 47) como doadores de inóculos fecais e de conteúdo gástrico para o processo fermentativo *in vitro*.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA, protocolo nº 6006030315).

7.1.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Saúde Digestiva e Desempenho de Equinos (LabEqui), pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo localizada na cidade de Pirassununga, São Paulo.

7.1.2. Animais

Foram utilizados oito equinos machos castrados da raça Puro Sangue Árabe (idade 60 meses e peso corporal: 457 ± 28 kg), medicados contra endo e ectoparasitas e imunizados contra raiva, influenza, tétano e encefalomielite. Os cavalos foram alojados em baias individuais com piso de concreto coberto com cama de maravalha. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. Ao início e término de cada fase experimental, todos os animais foram monitorados com relação à higidez por meio de hemogramas mensurados por equipamento BIOCLIN.

7.1.3. *Período Experimental*

O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino duplo balanceado com oito animais (2 animais por tratamento), quatro dietas (Controle; Levedura Procreatin 7®; Actisaf HR Plus Sc 47® e adição da Levedura Procreatin 7® + Actisaf HR Plus Sc 47®). Os animais foram avaliados por quatro períodos de 22 dias cada, sendo 15 dias de adaptação à dieta, 5 dias de coleta total de fezes (CTF), 1 dia para coleta de conteúdo gástrico e 2 semanas de intervalo entre os períodos.

7.1.4. *Dietas*

A dieta concentrada foi produzida na fábrica de ração pertencente à Prefeitura do Campus Fernando Costa (USP/Pirassununga). Após a mistura, os ingredientes foram peletizados a temperatura máxima de 70 °C e com pressão de 1 m³.

O consumo diário individual adotado foi de 1,75% do peso corporal (PC) para atingir as exigências de cavalos adultos em manutenção (MARTIN-ROSSET, 2012) sendo 0,75% de concentrado e 1% de feno Tifton 85 (Tabela 1). As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia (07h00min e às 16h00min). Foi utilizada cultura comercial de levedura viva *Sacchamoryces cerevisiae* (Philleo Lesaffre Feed Additives, Toluca, México) onde todos os animais receberam o mesmo feno e os concentrados (Tabela 1) com ou não adição de levedura viva ou protegida.

Os tratamentos usados foram: dieta basal sem adição de levedura (tratamento controle- CTR); dieta basal com adição do Procreatin 7® - 15 g/animal/dia, despejado sobre o concentrado no momento do arrojamento (tratamento levedura viva - LEV); dieta basal com adição do Actisaf HR Plus Sc 47® - 20 g/animal/dia, incluída no momento da peletização do concentrado na fábrica de ração (tratamento levedura protegida – PROT); dieta basal com Actisaf HR Plus Sc 47® - 20 g/animal/dia + Procreatin 7® - 15 g/animal/dia: concentrado

peletizado com a levedura protegida + levedura viva, totalizando 35 g de levedura viva/animal/dia (tratamento L+P).

Tabela 7. Composição bromatológica (%) das dietas utilizada e ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais.

Composição bromatológica dos concentrados e feno (corrigidos para 100% de MS)						
ALIMENTOS	MS	MO	FDN	FDA	EE	PB
Feno	91,2	78,4	70,2	48,3	2,26	20,6
Concentrado Controle	89,0	78,1	25,0	9,3	7,3	15,0
Concentrado com Levedura Protegida	89,0	77,8	26,0	12,4	7,0	14,5
Ingredientes usados na fabricação dos concentrados experimentais (%)						
Farelo de trigo	43,0					
Farelo de milho	43,0					
Farelo de soja	4,0					
Óleo de soja	3,5					
Núcleo equino	3,0					
Calcário	2,5					
Sal comum	1,0					

Fonte: (POMBO, G.V., 2017)

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta.

7.2.5. Produção de gases *in vitro* fezes

Foi utilizado no ensaio a técnica semi-automática de produção de gases (MAURÍCIO et al., 1999), sendo que o inóculo utilizado foram as fezes sob o efeito dos tratamentos controle; levedura viva; levedura protegida e levedura viva + levedura protegida. As fezes foram retiradas diretamente da ampola retal de cada animal, 2 horas após a alimentação, filtradas em tecido de 45µm, e o filtrado (inóculo) mantido a 39 °C em banho-maria, sendo constantemente borrifado com CO₂ até a inoculação. Os substratos utilizados para a fermentação foram o mesmo feno de Tifton e o concentrado controle, fornecido aos animais, moído a 2mm. Foram utilizados quatros frascos com substrato de feno e três frascos de fermentação com substrato de concentrado para cada tratamento, totalizando 56 frascos. Cada frasco calibrado de 160 mL foi preparado previamente antes da coleta do inóculo, onde foi

adicionado 1g de amostra e borrifado com CO₂, em seguida foram fechados enquanto foi preparado o meio de cultura segundo Theodorou et al. (1994).

Após o preparo do meio de cultura, foram adicionados 90 ml em cada frasco, que em seguida estes foram mantidos em banho-maria a 39 °C. A partir de então foi efetuada a coleta e o preparo do inóculo. Com o inóculo devidamente preparado, adicionou-se 10 ml em cada frasco. Após a inoculação os frascos foram fechados e foi removida toda a pressão residual (zerados), em seguida retornaram ao banho-maria a 39 °C. As leituras da produção de gases foram efetuadas nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas. As leituras foram realizadas com o auxílio de um Transdutor de Pressão (LOGGER AG100, Datalogger Universal) que acoplado a um three-way e uma seringa possibilitou a aferição do volume de gás produzido. Os resultados gerados neste ensaio, possibilitaram gerar uma equação de calibração para o LabEqui. Assim, em experimentos futuros serão realizadas apenas as leituras de pressão, e a conversão da pressão por volume será efetuada por meio da equação gerada a partir dos dados gerados neste trabalho. Foram utilizadas 515 leituras de pressão e volume para gerar a regressão quadrática (SAEG, UFV). Com a equação calculou-se a equivalência de um PSI em volume de gases (mL).

$$V (mL) = 0,03474x^2 + 4,058x + 0,24990$$

A produção cumulativa de gases foi submetida à análise de variância e ajustada ao modelo bicompartimental descrito por France et al. (1993):

$$A = b \times [1 - e^{-c(t-L)}]$$

Onde:

A: é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo t;

b: é a produção de gás assintótico (mL/g de MS)

c: taxa de produção de gás/hora

L: representa o discreto tempo (horas) de colonização antes da produção de gases

Após o termino do processo fermentativo, os resíduos remanescentes nos frascos foram filtrados em bags porosos de 1 mm e os resíduos analisados para matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN).

7.2.6. *Produção de gases in vitro conteúdo gástrico*

Para conhecimento dos autores, foi a primeira vez que um ensaio de fermentação *in vitro* utilizando conteúdo gástrico foi realizado. Foi utilizado no ensaio a técnica semi-automática de produção de gases (MAURÍCIO et al., 1999), sendo que para esse ensaio, o inóculo utilizado foi o conteúdo gástrico de cada cavalo nos diferentes períodos, considerando os diferentes tratamentos: controle; levedura viva; levedura protegida e levedura viva + levedura protegida. Imediatamente após a coleta do conteúdo, os frascos de fermentação de 160 mL (THEODOROU et al., 1994) foram preenchidos com 100 mL de conteúdo gástrico e constantemente borrifados com CO₂. Para cada tratamento foram incubadas 3 réplicas, totalizando 24 frascos. Não foi usado substrato, apenas o conteúdo gástrico de cada animal foi incubado. Após a incubação dos frascos, estes foram fechados e foi removida toda a pressão residual (zerados), em seguida retornaram a estufa de ventilação forçada a 39 °C. As leituras da produção de gases foram efetuadas nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 horas. As leituras foram realizadas com o auxilio de um Transdutor de Pressão (LOGGER AG100, Datalogger Universal) que acoplado a um three-way e uma seringa possibilitou a aferição do volume de gás produzido.

A produção cumulativa de gases foi submetida à análise de variância e ajustada ao modelo bicompartimental descrito por France et al. (1993):

$$A = b \times [1 - e^{-c(t-L)}]$$

Onde:

A: é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo t;

b: produção de gás assintótico

c: taxa de produção de gases/hora

L: representa o discreto tempo (horas) de colonização antes da produção de gases

7.2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados como delineamento em quadrado latino, pelo programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Hartley.

A produção de gases foi analisada com as mesmas causas de variação, porém para análise dessas variáveis-resposta foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo referentes aos diferentes momentos de coleta, utilizando o procedimento MIXED do SAS. O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. O nível de significância do teste utilizado foi o de 5%.

7.2. RESULTADOS

O modelo matemático apresentou diferenças significativas quando se utilizou fezes como inóculo e feno como substrato. A taxa de produção de gás por hora (c) foi maior no grupo levedura viva do que no grupo levedura protegida, sem diferir do controle e do grupo levedura viva + protegida. Não foi observado efeito para a degradabilidade da matéria seca e para a fibra em detergente neutro (Tabela 8).

Tabela 8. Degradabilidade, produção de gás *in vitro* e gás acumulado das fezes, usando feno como substrato, após 48 horas após incubação nos diferentes tratamentos.

Item	Tratamento ⁵				EPM ⁶	P-valor
	CTR	LEV	PROT	L+P		
$A (mL \cdot g^{-1} MS)^1$	123,3	973,3	102,3	599,0	183,08	0,2934
$b (h^{-1})^2$	0,0365	0,0310	0,0462	0,0351	0,0033	0,4604
$c (h^{-1/2})^3$	-0,0286ab	-0,0203a	-0,0672b	-0,0290ab	0,0090	0,0190
$L (h)^4$	0,0000	0,1471	0,5141	0,0460	0,2104	0,1275
PG 1h	0,06	0,60	0,60	0,44	0,16	0,6074
PG 2h	0,88	1,54	1,03	1,54	0,34	0,8638
PG 3h	3,76	3,64	397	3,54	0,35	0,9771
PG 4h	3,71	4,27	3,40	4,13	0,21	0,4689

PG 5h	3,47	3,97	3,14	4,07	0,24	0,5011
PG 6h	3,25	3,55	3,11	3,68	0,24	0,8302
PG 8h	5,23	5,68	5,06	5,26	0,55	0,9825
PG 10h	4,63	5,63	5,33	5,09	0,58	0,9425
PG 12h	4,62	5,52	4,96	5,19	0,50	0,9335
PG 15h	5,61	5,77	5,63	7,02	0,44	0,6286
PG 18h	5,03	5,60	6,22	6,32	0,34	0,4907
PG 21h	4,38	4,77	5,95	5,33	0,32	0,3654
PG 24h	4,38	4,59	5,21	5,39	0,33	0,6707
PG 28h	4,96	5,34	5,32	6,60	0,40	0,5153
PG 32h	5,19	5,36	5,25	6,63	0,37	0,4744
PG 36h	4,91	6,28	5,97	5,86	0,46	0,7556
PG 40h	4,66	6,02	5,64	5,69	0,45	0,7429
PG 44h	4,24	5,66	5,08	5,02	0,45	0,7489
PG 48h	4,58	5,19	4,85	4,63	0,39	0,9459
DIVMSf ⁷	50,41	49,94	50,97	45,12	1,41	0,4506
DIVFNDf ⁸	49,89	48,72	47,82	47,68	0,79	0,7495

^{ab} Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05)

¹A = volume final ou produção potencial de gases

²b = produção de gás assintótico

³c = taxa de produção de gás/hora

⁴L = tempo de colonização

⁵ CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida

⁶EPM: erro padrão da média

⁷ DIVMSf: Degradabilidade *in vitro* da matéria seca do feno

⁸ DIVFNDf: Degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro do feno

Quando foi comparada a produção de gases, ainda usando fezes como inóculo, mas concentrado como substrato, não encontramos diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 9).

Tabela 9. Degradabilidade, produção de gás *in vitro* e gás acumulado das fezes, após 48 horas após incubação nos diferentes tratamentos.

Item	Tratamento ⁵				EPM ⁶	P-valor
	CTR	LEV	PROT	L+P		
A (mL. g ⁻¹ MS) ¹	222,06	235,71	242,71	216,36	5,7540	0,3619
b (h ⁻¹) ²	0,1809	0,1674	0,1380	0,1798	0,0041	0,5264
c (h ^{-1/2}) ³	-0,5927	-0,5560	-0,4557	-0,5938	0,0373	0,4513
L (h) ⁴	1,7200	1,5874	1,9741	1,7260	0,4987	0,7416
PG 1h	0,33	0,00	0,25	0,15	0,07	0,4872
PG 2h	0,57	0,17	1,09	0,45	0,26	0,6594
PG 3h	2,20	1,83	2,20	2,25	0,21	0,8950
PG 4h	4,77	3,49	4,00	3,91	0,33	0,5968
PG 5h	6,70	5,37	5,06	5,20	0,72	0,8329
PG 6h	9,08	7,51	6,68	6,95	1,18	0,8923
PG 8h	18,85	21,61	17,06	16,68	2,90	0,9283
PG 10h	21,85	25,91	21,34	23,41	2,99	0,9492
PG 12h	24,43	26,26	23,42	26,74	2,41	0,9573
PG 15h	32,38	30,49	29,83	31,23	1,02	0,8381
PG 18h	29,31	27,59	31,38	25,66	1,55	0,6098
PG 21h	20,19	22,89	27,67	19,63	1,99	0,4814
PG 24h	14,04	15,69	18,95	15,28	1,55	0,7150
PG 28h	10,18	10,21	12,95	11,18	0,99	0,7390
PG 32h	7,46	7,13	8,46	7,58	0,73	0,9310
PG 36h	4,93	4,41	5,23	4,61	0,47	0,9297
PG 40h	3,37	2,84	3,76	3,24	0,31	0,7466

PG 44h	2,19	1,70	1,76	1,83	0,22	0,8723
PG 48h	1,75	1,29	1,47	1,72	0,20	0,8373
DIVMSc ⁷	21,31	20,52	21,70	21,33	0,23	0,3489

¹A = volume final ou produção potencial de gases

²b = produção de gás assintótico

³c = taxa de produção de gás/hora

⁴L = tempo de colonização

⁵ CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida

⁶EPM: erro padrão da média

⁷ DIVMSc: Degradabilidade *in vitro* da matéria seca do concentrado

O modelo matemático apresentou diferenças significativas na constante *b* para a produção de gases assintótica, quando se usou conteúdo gástrico como inóculo. O grupo L+P, tiveram maiores taxa de PG sendo o controle e a protegida, menores taxas (Tabela 10). A produção de gás nos tempos 4, 5 e 6 horas, apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo de incubação nos tratamentos ($P < 0.05$).

Tabela 10. Produção de gás *in vitro* e gás acumulado do conteúdo gástrico, após as 16 horas após incubação nos diferentes tratamentos.

Item	Tratamento ⁵				EPM ⁶	P-valor
	CTR	LEV	PROT	L+P		
<i>A (mL. g⁻¹ MS)</i> ¹	5685	1309	12571	1015	258,96	0,4916
<i>b (h⁻¹)</i> ²	0,1467b	0,2385ab	0,1216b	0,3227a	0,0216	0,0484
<i>c (h^{-1/2})</i> ³	-0,3582	-0,3779	-0,2637	-0,6171	0,1226	0,2587
<i>L (h)</i> ⁴	1,606	1,819	0,608	1,921	6,4236	0,7480
PG 1h	0,87	10,05	7,16	22,45	3,33	0,1447
PG 2h	1,13	52,33	24,11	71,70	11,08	0,1309
PG 3h	14,69	110,15	53,76	149,95	19,08	0,0755
PG 4h	42,08	184,29	90,13	243,29	27,31	0,0499*
PG 5h	81,83	250,87	116,29	344,51	35,40	0,0456*
PG 6h	118,53	318,83	151,14	412,57	40,81	0,0483*
PG 7h	154,97	366,62	180,62	463,03	40,81	0,0605
PG 8h	187,46	407,55	208,96	507,66	49,39	0,0776
PG 9h	215,29	445,41	231,47	536,39	51,61	0,0878
PG 10h	246,82	484,90	268,86	563,71	55,60	0,1312
PG 11h	276,96	511,67	304,41	587,56	59,33	0,1903
PG 12h	302,52	543,10	335,27	609,86	62,18	0,2312
PG 13h	333,40	565,78	364,99	631,27	65,86	0,3033
PG 14h	360,53	596,52	395,24	652,14	69,35	0,3609
PG 15h	390,61	617,89	422,78	674,69	72,93	0,4287
PG 16h	419,15	634,37	454,33	695,40	76,71	0,5090

¹A = volume final ou produção potencial de gases

²b = produção de gás assintótico

³c = taxa de produção de gás/hora

⁴L = tempo de colonização

⁵ CTR: controle; LEV: levedura viva; PROT: levedura protegida; L+P: levedura viva + levedura protegida

⁶EPM: erro padrão da média

7.3. DISCUSSÃO

O objetivo do estudo era avaliar a degradação de alguns nutrientes da dieta de equinos suplementados com levedura viva ou protegida, com diferentes inóculos. Foi possível observar a PG nos diferentes inóculos, sendo que os perfis de acumulação de gases foram distintos quando se utilizou o mesmo inóculo e diferentes substratos. Quando observamos a fração *c* no modelo matemático, a levedura viva apresentou maiores valores de taxa de produção de gás do que a levedura protegida. Salem et al. (2016), ao contrário do encontrado no estudo, suplementando cavalos com diferentes produtos comerciais de levedura, apresentaram menores valores para a levedura viva, e justificaram uma maior taxa de produção de gás/hora no grupo com levedura revestida com parede de levedura como indicador de maior digestibilidade dos nutrientes, permitindo então, maior consumo de alimento, diminuindo o preenchimento físico do ceco, aumentando a densidade de energia líquida das dietas e estimulando a produção de proteína microbiana. Acreditamos que maiores taxas da levedura viva, representam que o produto foi aproveitado rapidamente pelos microrganismos fecais e a levedura protegida suportou melhor a carga bacteriana. Elghandour et al. (2014) não encontraram diferenças nas PG em nenhuma das frações com uso de levedura.

A taxa de produção de gases parece ser menor quando se utiliza feno como substrato e maior quando se utiliza concentrado como substrato. De Fombelle et al. (2003), atribuíram esses efeitos aos diferentes substratos utilizados na incubação. Lowman (2002) relatou maior produção de gás com uso de aveia quando incubado com líquido de ceco comparado as fezes, mas nenhuma diferença foi encontrada quando se utilizou de polpa de beterraba como substrato.

As fezes dos equinos contêm maior número de microrganismos viáveis (UDEN & VAN SOEST, 1982) por unidade de matéria seca em comparação com fezes de ruminantes,

pois o cavalo é um fermentador de intestino posterior e, portanto, os microrganismos não são submetidos a digestão enzimática antes de defecação, como é o caso no ruminante. Uma menor PG com uso de feno, reflete o potencial de fermentação da dieta (ELGHADOUR et al., (2014; SALEM et al., 2016) e depende principalmente da disponibilidade dos nutrientes para os microrganismos do inócuo durante a fermentação (AHMED & ABDELI, 2007). Quando menos gás é produzido por unidade de peso do substrato verdadeiramente degradado, proporcionalmente mais substrato é convertido em biomassa microbiana (ELGHADOUR et al., (2014; SALEM et al., 2016).

A falta de observação de diferenças entre a DIVMS e DIVFDN, pode ser devido as diferentes condições entre incubação *in vitro* e o *in vivo*. A incubação é um processo fechado, com número de microrganismos por grama de conteúdo fecal, diferente do real (LATTIMER et al., 2007).

A diferença observada com inóculo do conteúdo gástrico no modelo matemático era esperada. Pois, no tratamento com levedura protegida, levando em consideração a proteção com levedura seca que o produto possui o contato com o meio aquoso não deveria fazer com que ela sofresse nenhuma alteração. O grupo PROT e CTR apresentaram menores taxas para a constante *b*, pois, provavelmente a PROT permaneceu estável durante o ensaio, auxiliando na remoção do oxigênio do meio, favorecendo as bactérias consumidoras de fibras e o CTR provavelmente precisou de maior tempo para hidratação, fixação e colonização do substrato pelos microrganismos. Segundo Jouany et al. (2009), um mecanismo positivo da levedura SC é a melhora da atividade enzimática das bactérias celulolíticas, sem diretamente agir, na população microbiana. O tratamento LEV e L+P, possuía levedura viva, que em contato com o meio aquoso, foram aproveitadas pelos microrganismos de forma mais rápida, isso explicaria maiores taxas na fase assintótica.

7.4. CONCLUSÃO

Concluimos que a inclusão da levedura viva e levedura viva protegida (*Saccharomyces cerevisiae*), não apresenta efeito quanto a degradabilidade *in vitro* dos componentes da dieta de equinos com base em fezes como inóculo.

A fermentação com inóculo de fezes possui maiores taxas de produção de gás quando se utiliza feno como substrato e suplementação com levedura viva.

Quando se utiliza de conteúdo gástrico como inóculo, a levedura protegida apresenta menor produção de gases.

7.6. REFERENCIAS

- Ahmed GM, Abdel NM. Chemical composition and *in vitro* gas production characteristics of six fodder trees, leaves and seeds. Res. J. Agric. Biol. Sci. 2007; 3:983-986.
- De fombelle A, Varloud M, Goachet AG, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, Julliand V. Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. Anim Sci, 2003; 77:293–304.
- Desrousseaux G, Santos AS, Pellikaan, WF, Van Der Poel AFB, Cone JW, Guedes CMV, Ferreira LMM, Rodrigues, MAM.. Effect of collection time on the fermentative activity of microbes in equine faeces. Ani Feed Sci Technol, 2012; 178:183– 182.
- Drogoul C, De Fombelle A, Julliand V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: Effect of three hay: grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. J Equine Vet Sci, 2001; 21:487-491.
- Elghandour MMY, Chagoyán JCV, Salem AZM, Kholif AE, Castaneda JSM, Camacho LM, Buendia G. In vitro fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. J Equine Vet Sci, 2014; 34:619-625.
- Holter P. Concentration of oxygen, carbon dioxide and methane in the air within during pats. Pedobiologia, 1991; 35:381-386.
- Lattimer JM, Cooper SR, Freeman DW, Lalman DA. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro fermentation of a high concentrate or high fiber diet in horses using equine fecal inoculums in Daisy II incubator. J Anim Sci, 2007; 85:2484-2491.
- Lowman RS, Theodorou MK, Cuddeford D. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. Ani Feed Sci Technol, 2002; 97:221-237.
- Martin-Rosset W. Nutrition et alimentation des chevaux. França: Quae, 2012.
- Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Ani Feed Sci Technol, 1999; 79:321-330.

Mclean BML, Afrazadeh A, Bates L, Mayes RW, Hovell FDD. Voluntary intake, digestibility and rate of passage of a hay and a silage fed to horses and cattle. *Proc Br Soc Anim Sci*, 1995:164

National Research Council (NRC): Nutrient Requirements Of Horses, 6th ed. Washington DC: National Academy Of Sciences, 2007.

Salem AZM, Elghandour MMY, Kholif AE, Barbosa A, Camacho LM, Odongo NE. Influence of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation of feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count, and in vitro fecal fermentation. *J. Equine Vet Sci*, 2016;39:12-19.

Uden P, Van Soest PJ. Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fibre by ruminants equine and rabbits. *Br J Nutr*, 1982; 47: 267-272.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da suplementação com levedura viva ou levedura protegida *Saccharomyces cerevisiae*, não induz mudanças na digestibilidade os nutrientes da dieta e não altera parâmetros fisiológicos.

A adaptação realizada para coleta do conteúdo gástrico apresenta fácil aplicabilidade, com alta tolerância pelos equinos, além de proporcionar perfeita precisão do local de coleta a ser avaliado.

A levedura viva e levedura protegida *Saccharomyces cerevisiae*, não apresenta efeito quanto a degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro.

A fermentação com inóculo de fezes possui maiores taxas de produção de gás quando se utiliza feno como substrato e suplementação com levedura viva.

Quando se utiliza de conteúdo gástrico como inóculo, a levedura protegida apresenta menor produção de gases.

9. IMPLICAÇÕES

Os dados apresentados nesse trabalho trazem informações relevantes para o mercado do cavalo. O uso da levedura viva é uma prática entre as empresas de rações, mas o uso da levedura viva protegida é algo inédito na alimentação equina.

Os resultados controversos sobre a melhora na digestibilidade dos nutrientes com uso do probiótico, desafia as empresas a encontrarem valores adequados para uso da levedura viva, tornando prático o uso em qualquer categoria.

O uso de técnicas *in vitro* para determinação de parâmetros fisiológicos em equinos é bem difundida, porém, pouco usada. As técnicas *in vitro* além de menos onerosas, trazem mais conforto aos animais e necessitam de menos tempo para o período experimental e permite trabalhar com menor número de pesquisadores.

Visando o uso de novas técnicas, a metodologia proposta para estudo da fisiologia gástrica, apresenta bons resultados, alta quantidade de material viável e pouco ou nenhum desconforto aos animais.