

LAURA FANTUCCI DE OLIVEIRA MATHEUS

Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos



Pirassununga
2016

LAURA FANTUCCI DE OLIVEIRA MATHEUS

**Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras
(*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para
gatos adultos**

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

Departamento:
Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:
Nutrição e Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto

Pirassununga - SP

2016

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.3359
FMVZ

Matheus, Laura Fantucci de Oliveira
Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos / Laura Fantucci de Oliveira Matheus. -- 2016.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto.

1. Ácidos graxos de cadeia curta. 2. Aminoácidos biogênicos. 3. Felinos. 4. Fermentação.
5. Microbiota fecal. I. Título.



São Paulo, 01 de julho de 2016
CEUA N 3283091014

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Márcio Antônio Brunetto
Área: Nutrição E Produção Animal
Marcio Antonio Brunetto (orientador)

Título do projeto: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DIGESTIVOS, FERMENTATIVOS E IMUNOLÓGICOS DE LEVEDURAS (SACCHAROMYCES CEREVISIEA) INATIVADAS E ENRIQUECIDAS EM MEIO DE CULTURA EM DIETAS PARA GATOS ADULTOS."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 30/junho/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são consideradas importantes matérias primas na nutrição animal pela sua capacidade prebiótica. Assim, os processos produtivos modernos têm como intuito a produção de leveduras com elevado potencial prebiótico. Este estudo objetivou avaliar os efeitos de teores crescentes de leveduras com metabólitos ativos (LSC; baseada na fermentação de substratos específicos) na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, microbiota e produtos da fermentação fecal e parâmetros imunológicos de gatos adultos. Foram utilizados 27 gatos adultos, idade média de $9,44 \pm 5,35$ anos, machos e fêmeas, sem raça definida e saudáveis. Os animais foram distribuídos em delineamento em blocos casualizados (idade), constituído de três tratamentos experimentais, denominados: DC (dieta controle), LSC 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LSC 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos). Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey."

Comentário da CEUA: "Alteração de título aprovada."

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MATHEUS, Laura Fantucci de Oliveira

Título: **Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Laércio e Telma,

Aos meus avôs Nelson (in memorian) e Welson (in memorian),

Ao Romero Basso,

Por todo amor, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção e força nos momentos difíceis que foram essenciais na execução deste trabalho.

Aos meus pais, Laércio de Oliveira Matheus e Telma Fantucci de Oliveira Matheus, e meu irmão, Hugo Fantucci de Oliveira Matheus por todo carinho, amor e dedicação em minha educação e pela confiança que sempre depositaram em mim.

Aos meus avós Nelson de Oliveira Matheus (*in memoriam*), Aparecida Guidoni de Oliveira Matheus, Welson Fantucci (*in memoriam*) e Leonor Oliveira Fantucci que foram fundamentais na minha educação.

Ao Romero Basso por todo carinho, paciência e companheirismo que estavam presentes nas horas mais difíceis desta etapa.

À Tatiane Chud não só por ser amiga e cunhada de longa data, mas também pelas contribuições científicas que foram muito importantes para o desenvolvimento deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto pela oportunidade, confiança, amizade, paciência e motivação que foi essencial para a minha formação profissional e pessoal.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade.

À todos os docentes do Departamento de Nutrição e Produção Animal, os quais foram importantes para minha formação.

À todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal, em especial ao João Paulo de Oliveira Barros, Alessandra de Cassia Terassi da Silva, Fábiana Silene Iaderozza, Renata Maria Consentino Conti, Simi Luiza Durante Aflalo e Lucinéia Mestieri.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo Fapesp 2015/03994-2).

À Premier Pet, por possibilitar a produção das dietas e utilização de sua estrutura de pesquisa para condução deste estudo.

À toda equipe da Premier Pet: Cristiana Pontieri, Juliana Jeremias, Danilo Souza, Iris Kawachi, Paula Takeara, Mariana Monti, Brown, Juliana, Suzana, Leda e Claudemir por todo auxílio e paciência na execução do experimento.

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

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva e todos os membros do Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, em especial ao Johnny Maciel de Souza, por todo auxílio nas análises de microbiologia.

À Profa. Cristina de O. Massoco Salles Gomes e todos os membros do Laboratório de Farmacologia Departamento de Patologia da FMVZ/USP, por todo auxílio nas análises de parâmetros imunológicos.

Aos membros do GENP (Grupo de Estudos em Nutrição Pet): Mariane Ceschin Ernandes, Patrícia Massae Oba, Karine de Melo Santos, Maria Isabel Gonzalez Urrego, Cláudio Galeno Piantino, Thiago Vendramini, Beatriz Kiihl Roque, Maria Cecília Lanchote e Andressa do Amaral pela colaboração, conversas, risadas, conhecimentos compartilhados e convivência.

À Mariane Ceschin Ernandes, por todo o auxílio na condução deste estudo, mas principalmente por ter se tornado uma grande amiga, que me acolheu sempre que precisei.

Ao João Paulo Fernandes dos Santos, por toda ajuda e paciência nas horas que mais precisei e não apenas pelas contribuições científicas, mas também pelas conversas, risadas e amizade.

Aos amigos de Pós-Graduação do VNP que me acompanharam nesta fase, em especial a Gabriela Pombo, por ter se tornado uma irmã, dividindo muito mais que um aluguel!

Aos meus anjos de quatro patas, Negão (*in memorian*), Mel (*in memorian*), Nina, K-pitu, Sancha, Acerola e Isis, os quais serei eternamente apaixonada.

Agradeço a todos os gatos que participaram do presente estudo: Alemão, Arisco, Bartira, Belfort, Betina, Brigitte, Britney, Black, Donatella, George, Julieta, Lady, Lindinha, Lindinho, Maitê, Maria, Manda Chuva, Merlim, Miski, Neo, Ronaldo, Safira, Sara e Tabata do Gatil do Centro de Desenvolvimento Nutricional Premier Pet, por terem colaborado com o experimento.

Obrigada a todos

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

(Cora Coralina)

“Tua caminhada ainda não terminou... a realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.”

(Charlie Chaplin)

“O futuro pertence a aqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

MATHEUS, L. F. O. **Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos.** [Effects of increasing levels of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on digestibility, fecal fermentation and immunological parameters in diets for adult cats]. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são consideradas importantes matérias primas na nutrição animal pela sua capacidade prebiótica. Os prebióticos são compostos não digeridos pelo organismo animal, mas que são fermentados pelos microrganismos do trato gastrintestinal, cujos produtos são capazes de prover benefícios ao hospedeiro. A fermentação depende de fatores como: substrato utilizado para o seu crescimento, método de fermentação, modo e condição de secagem e idade das células. Assim, os processos produtivos modernos têm como intuito a produção de leveduras com elevado potencial prebiótico. Este estudo objetivou avaliar os efeitos de teores crescentes de leveduras com metabólitos ativos (LSC; baseada na fermentação de substratos específicos) na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, microbiota e produtos da fermentação fecal e parâmetros imunológicos de gatos adultos. Foram utilizados 27 gatos adultos, idade média de $9,44 \pm 5,35$ anos, machos e fêmeas, sem raça definida e saudáveis. Os animais foram distribuídos em delineamento em blocos casualizados (idade), constituído de três tratamentos experimentais, denominados: DC (dieta controle), LSC 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LSC 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos). Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Verificou-se que a inclusão do aditivo alterou apenas a digestibilidade aparente da fibra bruta, da matéria mineral e energia metabolizável ($p < 0,05$). Já em relação aos produtos da fermentação e microbiota das fezes, observou-se redução em ácido lático ($p = 0,0040$) e *Clostridium perfringens* ($p = 0,0226$) com a inclusão do prebiótico e diminuição do ácido isovalérico ($p = 0,0144$) no tratamento LSC 0,3. Pode-se concluir que o aditivo, nos teores de inclusão avaliados, parece apresentar potencial prebiótico em relação aos produtos da fermentação e microbiota fecal.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta. Aminas biogênicas. Felinos. Fermentação.

Microbiota fecal.

ABSTRACT

MATHEUS, L. F. O. **Effects of increasing levels of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on digestibility, fecal fermentation and immunological parameters in diets for adult cats.** [Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos]. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Saccharomyces cerevisiae yeast are considered important raw materials in animal nutrition due their prebiotic capacity. Prebiotics are compounds not digested by animal organism, but are fermented by microorganisms in the gastrointestinal tract, which products are capable of providing benefits to the host. The fermentation depends on factors such as: substrate used for growth, fermentation method, way and drying condition and age of the cells. Thus, modern production processes have the objective of producing yeast with high prebiotic potential. This study aimed to evaluate the effects of increasing levels of yeast with active metabolites (LSC) based on the fermentation of specific substrates on apparent digestibility of diet nutrients, microbiota and fecal fermentation products and immunological parameters in adult cats. Twenty seven male or female cats with mean weight of 4.19 ± 0.83 kg and mean age of 9.44 ± 5.35 years were used and distributed in an unbalanced randomized block design (age), consisting of three experimental treatments, DC (control diet), LSC 0.3 (control diet with 0.3% yeast with active metabolites) and LSC 0.6 (control diet with 0.6% yeast with active metabolites). The results were analyzed using the computer program Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), with significance level of $p < 0.05$ and the averages compared by Tukey test. The inclusion of the additive only changed the apparent digestibility of crude fiber and mineral content ($p < 0.05$). Regarding the fermentation products and microbiota of feces, there was a reduction in lactic acid ($p = 0,0040$) and *Clostridium perfringens* ($p = 0,0226$) with inclusion of prebiotic and decreased of isovalerate ($p = 0,0144$) in the LSC 0.3 treatment. It can be concluded that the additive, in the levels of inclusion assessed, seems to have prebiotic potential on fecal fermentation products and microbiota.

Keywords: Short-chain fatty acids. Biogenic amines. Felines. Fermentation. Fecal microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias para síntese de ácidos graxos de cadeia curta a partir da fermentação de carboidratos	22
Figura 2 - Vias para síntese de amins biogênicas	24
Figura 3 - Esquema experimental.....	30
Quadro 1 - Descrição das fases experimentais	30
Quadro 2 - Resultados de pesquisas com o uso de prebióticos na digestibilidade dos nutrientes, microbiota e produtos da fermentação de cães e gatos.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulação e composição química das dietas experimentais	29
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na detecção quantitativa de diferentes grupos bacterianos em amostras fecais de gatos.....	33
Tabela 3 - Consumo de matéria natural, matéria seca e dos nutrientes, produção e escore fecal e coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes	43
Tabela 4 - Valores médios de pH e concentração de ácido láctico, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada encontrados no estudo	45
Tabela 5 - Concentração de aminas biogênicas observadas no estudo	47
Tabela 6 - Resultados do PCR em tempo real relativo observados no estudo.....	48
Tabela 7 - Resultados da imunofenotipagem de linfócitos, teste de fagocitose e burst oxidativo encontrados no estudo	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Leveduras	16
2.2	Prebióticos.....	18
2.3	Microbiota.....	19
2.4	Produtos de fermentação	21
2.5	Imunologia	24
3	OBJETIVO	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Local de condução do ensaio	28
4.2	Delineamento experimental, dietas experimentais e manejo dos animais	28
4.3	Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal	31
4.4	Determinação da concentração fecal de bactérias de interesse pela técnica de PCR em tempo real.....	32
4.5	Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e ácido láctico	33
4.6	Determinação do pH fecal.....	34
4.7	Determinação de aminas biogênicas	35
4.8	Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes	35
4.9	Teste de fagocitose e <i>burst</i> oxidativo.....	36
4.10	Obtenção de linfócitos sanguíneos.....	36
4.11	Teste de linfoproliferação	37
4.12	Imunofenotipagem de linfócitos	37
4.13	Análises estatísticas.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o mercado pet food e os produtos e serviços destinados aos animais de companhia têm crescido de forma significativa. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), o Brasil possui a quarta maior população de animais de estimação mundial, o que totalizam 200 milhões de pets. Destes, 52,2 milhões são cães e 22,1 milhões são gatos, sendo que a população canina ultrapassa o número de crianças nos lares brasileiros, que representa 44, 1 milhões. O Brasil se mantém na segunda posição mundial no ranking em relação à população de cães e gatos no mundo, sendo superado apenas pelos Estados Unidos.

A introdução de alimentos comerciais funcionais com o objetivo de trazer benefícios à saúde de animais de companhia ocorreu nas últimas décadas, devido ao aumento significativo na população de cães e gatos associado à estreita relação afetiva entre estes animais e os seres humanos, sendo os primeiros, considerados membros das famílias, fatores que refletiram na maior conscientização dos proprietários em relação a escolha dos alimentos (GOMES, 2009).

Similar à nutrição humana, a nutrição de animais de companhia está em constante avanço e os nutricionistas buscam ingredientes funcionais que promovam benefícios além da nutrição básica (MIDDELBOS, 2007a), pois a longevidade e a qualidade de vida de cães e gatos são as grandes preocupações dos tutores. Neste sentido, surge a incorporação de diversos ingredientes funcionais nos alimentos, dentre os quais destacam-se os prebióticos, que são definidos como ingredientes nutricionais não digeríveis, que produzem benefícios ao hospedeiro por estimularem de forma seletiva o crescimento e a atividade de um grupo ou mais de bactérias intestinais benéficas (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Segundo Hesta et al. (2001) a função desempenhada pela microbiota intestinal na saúde do hospedeiro ocasionou grande interesse pela modulação da composição destes microrganismos presentes no trato gastrintestinal, a qual é responsável pela produção de diversos compostos, principalmente com a utilização de ingredientes com potencial efeito prebiótico.

As leveduras secas de cervejaria e de cana de açúcar, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, se apresentam como importantes matérias primas na nutrição animal, pelo alto conteúdo proteico, caracterizando-se como importante fonte proteica para diversos animais

(PEREIRA, 2001; MOREIRA et al., 2002; CASTILHO, 2004; PEZZATO, 2006; MARTINS, 2009), de vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina) e de minerais, além de possuírem componentes com potencial capacidade prebiótica (MIDDELBOS et al., 2007; GOMES, 2009; SANTOS et al., 2015), características que as enquadram como alimento funcional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leveduras

Segundo Bourgeois e Larpent (1995) as leveduras tratam-se de um grupo de microrganismos com ampla utilização em diversos processos fermentativos, que possuem como vantagens em relação a outros microrganismos a capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento e facilidade de separação de sua biomassa (ICIDCA, 1999). Sua produção é proveniente principalmente dos setores sucroalcooleiro, cervejeiro e de panificação (CHAUD et al., 2007).

As leveduras de cervejaria em processo industrial possuem habilidade de metabolizar eficientemente os constituintes do mosto, que é o caldo resultante da mistura fervida de malte e água, rico em açúcares fermentáveis. Esse caldo é filtrado, para receber o lúpulo e o fermento ser transformado em álcool e gás carbônico, a fim de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade sensorial satisfatória (CARVALHO et al., 2006). Nas destilarias de álcool (etanol) e nas cervejarias são gerados excedentes de células de levedura que, inativadas termicamente ou não, poderão ser usadas diretamente (células íntegras de levedura) ou serem processadas para obtenção de vários derivados (RAMOS et al., 2011), que são usualmente incorporadas à nutrição humana e animal.

Neste sentido, processos produtivos modernos tem objetivado a produção de leveduras com elevado potencial prebiótico, dentre os quais se destacam as leveduras produzidas através de fermentação anaeróbia com substratos baseados em líquidos e cereais selecionados, as quais parecem apresentar teores diferenciados de resíduos celulares, componentes da parede celular, nucleotídeos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e polifenóis, características estas que podem influenciar na modulação da microbiota intestinal e no *status* inflamatório e imunológico, além de realçar a capacidade antioxidante dos indivíduos.

Durante o processamento das leveduras, a partir da fermentação anaeróbica com substratos, líquidos e cereais selecionados, são produzidas leveduras com metabólitos ativos, que possuem em sua composição mananoligossacarídeos (MOS), beta glucanos, nucleotídeos,

ácidos orgânicos, polifenóis, aminoácidos, vitaminas e minerais. Desta forma, a levedura com metabólitos ativos, possui além das células residuais, o meio de fermentação e metabólitos.

No entanto, a composição centesimal da parede celular de levedura (PCL) é bastante variável, conforme relatado por Fleet (1991) que observaram que esta pode possuir entre 30 a 60% de glucanos, 25 a 50% de mananos, 13 a 15% de proteína, 2 a 14% de lipídio e 1 a 2% de quitina. Sendo que fatores relacionados ao processo de obtenção apresenta impacto relevante na composição do microrganismo, dentre os quais destacam-se: substrato utilizado para o seu crescimento, grau de aeração do meio, espécie da levedura, tratamento a que o meio de cultura é submetido, concentração de sais (BUTOLO, 1997), método de fermentação, modo e condição de secagem e idade das células (DESMONTS, 1968), fatores estes relacionados aos anseios das empresas produtoras. Dentre os componentes que podem constituir as leveduras com capacidade prebiótica, estão presentes os MOS e beta-glucanos, na parede celular (PCL), além do extrato celular rico em nucleotídeos.

Mananoligossacarídeos (MOS) são oligossacarídeos de interesse para várias espécies, apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico e a microbiota intestinal, ligam-se a ampla variedade de micotoxinas e preservam a integridade da superfície de absorção intestinal (ROBERFROID, 2002). A inclusão de MOS na dieta proporciona seleção de bactérias benéficas, ao invés de populações bacterianas como clostrídios e enterobactérias, devido a mudança de nutrientes utilizados pelos microrganismos no intestino grosso (TORTORA et al., 2002).

As β -glucanas são polissacarídeos também constituintes estruturais da parede celular de leveduras, obtidas a partir da fermentação *S. cerevisiae*, constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3), com cadeias laterais de tamanhos variados, igualmente de glicose, porém, unidas em β (1-6) (DIJKGRAAF; LI; BUSSEY, 2002). A β -glucana é caracterizada como um modificador da resposta biológica, que ocorre, inicialmente, pelo seu reconhecimento por receptores presentes na superfície celular encontrados em macrófagos/monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células *natural killer* (NK) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; BROWN; GORDON, 2001).

Os nucleotídeos são capazes de produzir importantes efeitos fisiológicos no organismo e possuem funções como armazenamento de energia na forma de ATP, componente de enzimas (NAD, FAD), mensageiros de processos celulares (AMPc), intermediários de reações de síntese de glicogênio, glicoproteínas e ácidos graxos, entre outros (VILELA et al., 2000;

FEGAN, 2006). Os efeitos benéficos proporcionados pelos nucleotídeos descritos são: a modulação do status imune, com a diminuição de ocorrência de infecções por vírus e bactérias, auxílio no crescimento e recuperação de tecidos pela síntese de DNA e favorecimento do crescimento e desenvolvimento do intestino delgado (CARVER & WALKER, 1995; FERGAN, 2006). Estudos que utilizaram a suplementação de nucleotídeos demonstraram melhora das funções imunitárias em seres humanos (MARTINEZ-AUGUSTIN et al., 1997; GIL, 2002) e camundongos (NAVARRO et al., 1996; JYONOUCHI et al., 2003).

2.2 Prebióticos

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

Essas fibras dietéticas e oligossacarídeos não digeríveis são os principais substratos de crescimento dos microrganismos intestinais. Tais compostos estimulam o crescimento da população microbiana, como as *Bifidobacterias* e os *Lactobacillus* que são considerados benéficos à saúde humana (BLAUT, 2002). Alguns efeitos atribuídos aos prebióticos são a modulação de funções fisiológicas, como a absorção de cálcio, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da microbiota intestinal, a qual exerce papel fundamental na fisiologia gastrointestinal e a redução do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2002).

As populações de microrganismos do TGI sofrem influência de inúmeros fatores na colonização e diversidade, dentre os quais a disponibilidade de nutrientes, o pH luminal, a presença de substâncias antibacterianas naturais (bacteriocinas) e o estímulo do sistema imune (GOMES, 2009). Prebióticos são adicionados à dieta com o objetivo de estimular o

crescimento e a estabilidade das populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos (ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos láctico), em relação aos demais. Estes produtos de fermentação reduzem o pH luminal e, juntamente com outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas por esta mesma microbiota, podem inibir a proliferação dos microrganismos nocivos, tais como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella*.

Salmonella e *Escherichia coli*, microrganismos gram negativos, não possuem a capacidade de fermentação dos frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS), que podem ter seu crescimento reduzido com a presença desses compostos, desta forma podem ser utilizados como inibidores do crescimento de bactérias patogênicas (FLEMMING, 2005; GOMES, 2009).

Em cães, Middelbos et al. (2007b) incluíram teores crescentes de PCL (0%; 0,05%; 0,25%; 0,45% e 0,65%) na dieta e observaram tendência a comportamento cúbico para os *Lactobacillus spp.* e *E. coli*, ao empregar a técnica molecular, enquanto pela técnica de plaqueamento, o *Clostridium perfringens* apresentou tendência cúbica e a *E. coli* redução linear significativa, o que foi atribuído a afinidade do MOS às bactérias com fímbria tipo 1, que são expressas em *E. coli* e *Samonella spp.* Ao avaliarem a suplementação de PCL (2g/dia) para cães, Swanson et al. (2002) observaram tendência à redução na contagem de bactérias aeróbias no grupo suplementado com PCL em comparação ao tratamento controle, mas sem efeito sobre os gêneros bacterianos avaliados isoladamente (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *C. perfringens* e *E. coli*). Em gatos, ao avaliarem teores de PCL (0%, 0,2%, 0,4% e 0,6%) Santos et al. (2015) observaram aumento linear em *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, ácido graxos de cadeia curta e ramificada e aminas biogênicas fecal, bem como redução linear em *C. perfringens*.

2.3 Microbiota

A microbiota intestinal em eubiose possui função importante na digestão e metabolismo do hospedeiro, além de defesa natural contra a invasão de bactérias patogênicas (NRC, 2006). Sendo caracterizada, em cães e gatos, pela alta densidade populacional, ampla variedade e complexidade de interações entre as diversas espécies de microrganismos que a

compõe (AQUINO, 2009). Grupos específicos de microrganismos habitam diferentes regiões do TGI capazes de produzir grande variedade de compostos e enzimas que atuam no funcionamento intestinal, com efeitos sistêmicos ou locais, cujos resultados podem ser benéficos ou maléficos à saúde do hospedeiro (SANTOS, 2015). Esses produtos de fermentação podem afetar a fisiologia, nutrição, eficácia de fármacos, carcinogênese, processo de envelhecimento e a resistência do hospedeiro à infecção (TESHIMA, 2003).

No processo de colonização do TGI pelos microrganismos acreditava-se que, no útero, os fetos eram estéreis devido à barreira placentária e a colonização ocorria no momento do parto. No entanto, pesquisas recentes têm mostrado a possibilidade de que a colonização bacteriana pode iniciar na fase fetal e, assim, a presença de quaisquer bactérias no útero pode ser considerada fator prejudicial ao feto (RODRÍGUEZ et al., 2015; SANTOS, 2015), o que pode influenciar no desenvolvimento imunológico do indivíduo (THUM et al., 2012; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015; SANTOS, 2015), devido a competição por sítios de ligação entre os microrganismos do TGI.

A modulação da microbiota intestinal é fundamental para a determinação dos efeitos benéficos, e para isto, é necessário conhecer as principais espécies bacterianas presentes no trato gastrointestinal (TGI). Em relação à composição bacteriana de fezes de gatos adultos, Deng e Swanson (2015) mencionaram em revisão de literatura que Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria são os filos bacterianos mais abundantes na microbiota fecal de cães e gatos, sendo que, de forma geral a predominância de Firmicutes e Bacteroidetes também é similar aos seres humanos, no entanto, as proporções dessas bactérias podem variar de acordo com o indivíduo, ambiente, métodos de extração de RNA, primers e métodos de sequenciamento.

Minamoto et al. (2012) mencionaram também em revisão de literatura a presença de mais de 99% da microbiota, as populações de Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria das fezes de felinos. Entretanto Barry et al. (2012) relatam Firmicutes (36,3% – 49,8%), Bacteroidetes/Chlorobi (36,1% – 24,1%), Proteobacteria (12,4% – 11,1%) como predominantes, e Actinobacteria com menor prevalência. Bell et al. (2014) citaram Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria compondo mais de 98% da microbiota fecal de gatos adultos.

Em cães de diferentes faixas etárias, Gomes (2013) observou que os animais filhotes (10 meses de idade) apresentaram maior concentração fecal de *Bifidobacterium* spp. e

Clostridium cluster IV em comparação aos animais adultos (5 a 6 anos de idade) e idosos (10 a 13 anos de idade), além disso a autora verificou elevada capacidade sacarolítica dos animais filhotes em comparação aos idosos, com significativa diferença nas concentrações fecais de ácido acético, propiônico, butírico e total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

A microbiota intestinal possui consideráveis alterações no processo de colonização ao longo da vida dos indivíduos, com conseqüente modulação na produção de metabólitos oriundos do metabolismo fermentativo das bactérias intestinais e na morfologia intestinal e imunidade. Estudos relatam aumento significativo na concentração fecal de bactérias patogênicas indesejáveis com o avançar da idade de animais de companhia (HUSSEIN et al., 1999; HUSSEIN; SUNVOLD, 2000; GOMES, 2009).

2.4 Produtos de fermentação

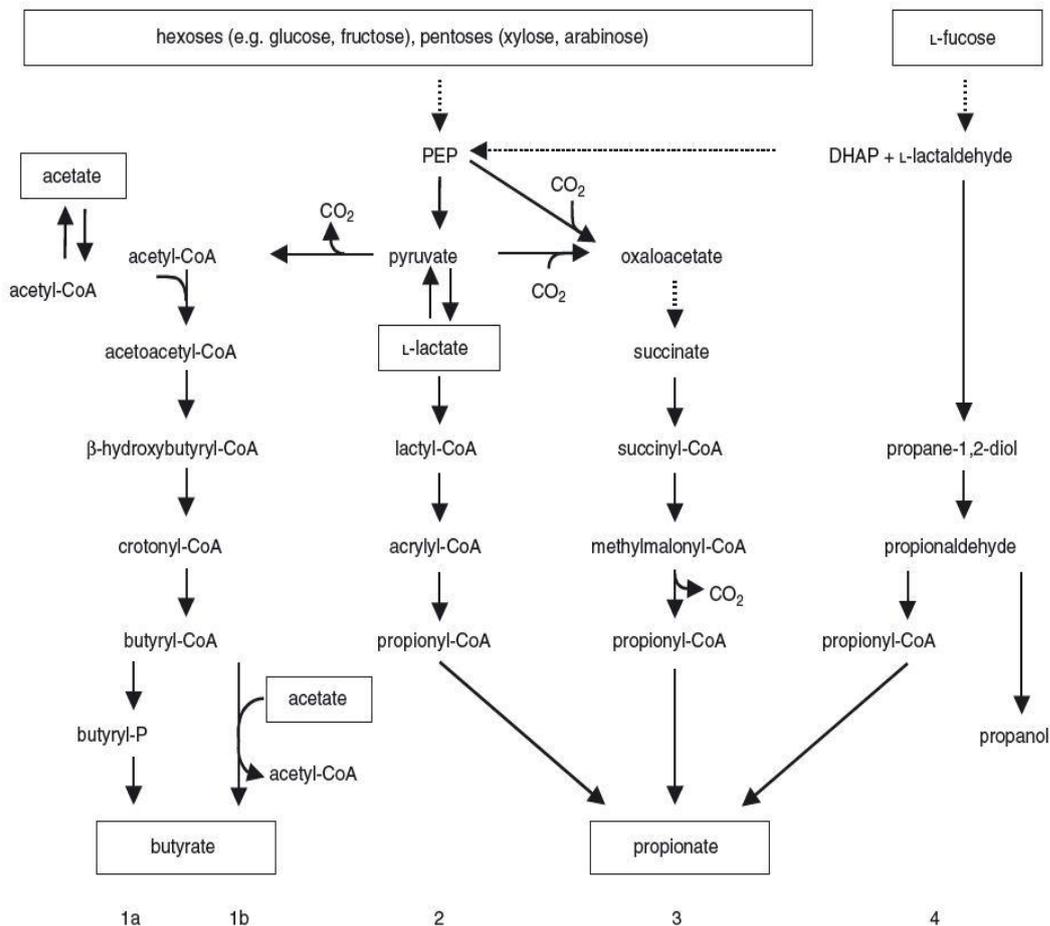
Os microrganismos, para atender suas exigências, utilizam carboidratos, proteínas e lipídios, para a formação dos produtos de fermentação, entretanto, dependendo do microrganismo, enzimas e nutriente utilizado podem ser gerados tipos específicos de compostos.

Dentre os produtos gerados na fermentação dos prebióticos estão os ácidos graxos de cadeia curta, importantes substâncias associadas à proliferação celular por seu papel no metabolismo energético dos colonócitos (WALKER; DUFFY, 1998). Os AGCC mais importantes na nutrição são os ácidos: acético, propiônico e butírico, que são, geralmente, produzidos na relação 3:1:1 (COMMANE et al., 2005), que possuem efeitos benéficos, sendo sua função relacionada à nutrição das células intestinais. Porém, há vários componentes putrefativos, que são considerados tóxicos ao hospedeiro como, por exemplo, aminas biogênicas, amônia, indol e fenol.

Várias vias metabólicas estão presentes na formação dos AGCC. De forma sucinta, a síntese de ácido acético ocorre através da hidrólise do acetil-CoA, formado a partir do piruvato, que produz CO₂, o qual é convertido com grupo metil e CoA à acetil-CoA. Entretanto a maior parte do piruvato é convertido à acetil-CoA. Já na síntese de ácido propiônico, três vias metabólicas podem estar envolvidas, sendo elas: via do succinato, via da fucose e via do acrilato pela rota do lactato. Na formação do ácido butírico, ocorre a reação

inversa de beta oxidação, bem como duas rotas alternativas, a primeira pela ação da fosfotransbutirilase e butirato-quinase, e a segunda que emprega uma via de CoAtransferase, que transfere a fração CoA do butiril-CoA para o acetato. Em relação à última via, salienta-se que o acetato estimula a rota da CoA-transferase, para detoxificação de seu excesso, sendo que bactérias adaptadas para sobreviver em ambientes diferentes do lúmen intestinal possuem rota da butirato-quinase, a qual não depende de altas concentrações de acetato, o que pode permitir que estas bactérias sobrevivam a ampla gama de condições ambientais (LOUIS et al., 2007; DEN BESTEN et al., 2013; SANTOS, 2015). Na Figura 1 estão esquematizadas as vias metabólicas para formação dos principais AGCC.

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



Fonte: Adaptado de Louis et al. (2007)

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

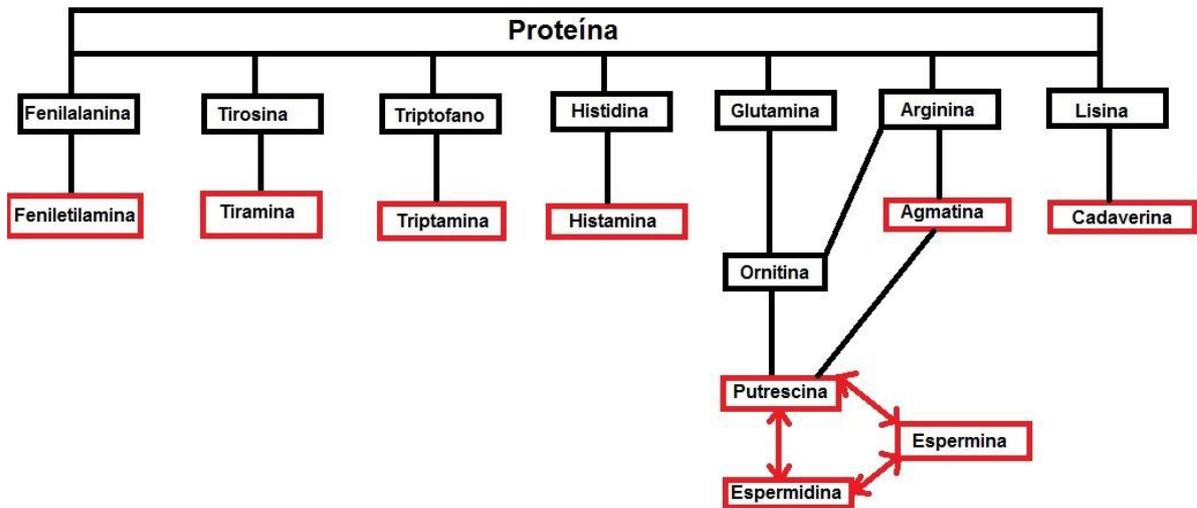
Outro composto considerado importante no metabolismo bacteriano, é o ácido láctico, por possuir a capacidade de reduzir o pH, o que pode resultar na redução de bactérias potencialmente patogênicas (CARBONERA; ESPÍRITO SANTO, 2010).

Em relação às aminas, substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular sintetizadas durante o processo metabólico em todos os organismos vivos, sua formação ocorre principalmente pela descarboxilação de aminoácidos pelos microrganismos do TGI. Outra forma seria pela transaminação de aldeídos ou cetonas e hidrólise de compostos nitrogenados (HUSSEIN et al., 1999). Quanto à via biossintética, as aminas classificam-se em naturais e biogênicas. As aminas biogênicas de importância são: feniletilamina, tiramina, triptamina, histamina, putrescina, espermina, espermidina, agmatina e cadaverina.

Desta forma, estas podem ser classificadas quanto ao número de grupamento amina na molécula, em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina). De acordo com a estrutura química as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina), com relação à estrutura química, podem ser classificadas de acordo com o grupo químico que apresentam em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolininas (histamina) e ainda ao grau de substituição do hidrogênio, existem as aminas primárias, secundárias e terciárias, em que, respectivamente, ocorre substituição de um, dois ou três hidrogênios (ROSSATO, 2005).

Na figura 2 estão ilustradas as vias para síntese de aminas biogênicas.

Figura 2 - Vias para síntese de amins biogênicas



Fonte: Adaptado de Halász et al. (1994).

Entretanto, mesmo com evidências dos efeitos indesejáveis das amins, as poliaminas são consideradas importantes, pois estão relacionadas com a maturação da mucosa intestinal através da síntese de DNA, RNA e protéica. Devido a sua rápida absorção no intestino delgado, a produção microbiana de poliaminas é provavelmente de grande importância para o fornecimento desses compostos à mucosa do intestino grosso (MORRISON; MACKIE, 1997; SWANSON; FAHEY, 2007).

2.5 Imunologia

O intestino possui papel fundamental no sistema imunológico, já que mais de 65% das células imunocompetentes do corpo estão presentes na mucosa intestinal (SATYARAJ, 2011). Os alimentos ingeridos e seus produtos da digestão estão intimamente em contato com o vasto tecido linfóide presente na mucosa intestinal conhecido como GALT (tecido linfóide associado ao intestino - *gut associated lymphoid tissues*) e podem influenciar diretamente a função imune nesse tecido (SCHLEY; FIELD, 2002; KROLL, 2014). O GALT é composto por células que estão presentes na região da lâmina própria do intestino, entre as células

epiteliais (linfócitos epiteliais) e por tecido linfático organizado (placas de Peyer e linfonodos mesentéricos). Pesquisas sugerem que a utilização de fibras dietéticas fermentáveis e aditivos com capacidade prebiótica pode resultar na melhora de respostas imunológicas no GALT. Dentre os efeitos prebióticos, a modulação da microbiota intestinal pode provocar mudanças no sistema imune devido ao contato direto com bactérias ácido lácticas, produtos da parede celular ou componentes citoplasmáticos com células imunes no intestino, através da produção de ácidos graxos de cadeia curta que são derivados da fermentação e também de mudanças na produção de mucina (SCHLEY; FIELD, 2002).

Devido à capacidade de modulação da microbiota intestinal, tem sido sugerido que os prebióticos proporcionam benefícios na imunidade do hospedeiro. Substâncias com propriedades imuno-estimulatórias, como lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos podem influenciar no *status* imunológico através da produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose e indução de síntese de elevadas concentrações de imunoglobulinas (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999). Neste sentido, Swanson et al. (2002) relataram que a adição de MOS na dieta de cães elevou a concentração de linfócitos. Chizzotti (2012) ao utilizar frações purificadas de mananoproteínas em cães observou modulação da resposta inflamatória e Kroll et al. (2014) relataram atividade imunomoduladora do componente em cães também com a utilização de frações purificadas de mananoproteínas.

As mananoproteínas e sua porção de carboidrato-D-manano são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio-ambiente e determinam a especificidade imunológica de leveduras. Já as β - glucana desencadeiam mecanismos envolvidos na resposta imune, que incluem estímulo da hematopoiese (HOFER; POSPISIL, 1997), além da ativação de macrófagos, neutrófilos e de células NK (LEE et al., 2001; BROWN; GORDON, 2001; XIAO; TRINCADO; MURTAGH, 2004).

O mecanismo de fagocitose é constituído por uma série de eventos, desde o momento que a célula internaliza até a digestão da partícula. A ação dos neutrófilos ocorre através da ligação dos patógenos com receptores presentes na membrana celular (HENDERSON et al., 1993; INOUE et al., 1994). Os neutrófilos fagocitam o material particulado, o fagossomo se une com o lisossomo e produz estrutura denominada fagolisossomo. Os grânulos de estoque fundem-se ao fagolisossomo e o material englobado é degradado, e produzem citocinas com função pró-inflamatória, como TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-8; e citocinas que modulam as

atividades de linfócitos T e B, como o antagonista de receptor IL-1 e TGF- β . Há liberação de defensas, enzimas que tornam a membrana do patógeno permeável e oxidases, que geram espécies reativas de oxigênio (ERO), que destroem os patógenos, em processo chamado como *burst* oxidativo (PIER, 2004).

Burst oxidativo é a metabolização do oxigênio molecular a O_2^- pelo sistema NADPH oxidase, que induz o aumento no consumo de oxigênio não-mitocondrial e a formação de metabólitos reativos do oxigênio. Estas substâncias são fundamentais para a destruição de microrganismos ingeridos para as células fagocíticas. Já para as células não-fagocíticas, o metabolismo oxidativo aumentado indica ativação celular. Os métodos de citometria de fluxo para determinação do *burst* oxidativo têm como objetivo a mensuração das reações oxidativas intracelulares, de forma individual. As células são permeadas por uma substância precursora não-fluorescente, que é oxidada pelos componentes do *burst* oxidativo, a um produto fluorescente (ADAMSON; SLOCOMBE, 1995).

Morfologicamente, os linfócitos, são as células mais simples e funcionalmente as distintas do sistema imunológico. Existem as células efetoras da imunidade adaptativa ou adquirida, que podem ser subdivididas em relação as suas moléculas de superfície e função. Após o reconhecimento do antígeno cognato, entram em processo de ativação e proliferação e transformam-se em células efetoras ou de memória. A resposta proliferativa de linfócitos pode ser realizada com o uso de mitógeno concanavalina A (ConA) e fitohemaglutina (PHA) (PIER, 2004).

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de teores crescentes de levedura com metabólitos ativos na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, produtos da fermentação fecal, microbiota e variáveis imunológicas de gatos adultos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de condução do ensaio

O experimento foi conduzido no Centro de Desenvolvimento Nutricional (CDN) da Premier Pet, localizado na cidade de Dourado, São Paulo, conjuntamente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, Pirassununga – SP. Todo o protocolo experimental foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) (protocolo CEUA número 3283091014).

4.2 Delineamento experimental, dietas experimentais e manejo dos animais

Foram utilizados 27 gatos SRD, machos e fêmeas, adultos e saudáveis. Os animais foram distribuídos em delineamento em blocos casualizados (idade), constituído de três tratamentos experimentais, denominados: DC (dieta controle), LSC 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos) e LSC 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos).

Foi formulada uma dieta controle, de modo a atender as exigências da AAFCO (2009) para felinos em manutenção, e a partir da mesma as inclusões de prebiótico foram desdobradas, conforme Tabela 1. Após a formulação, os ingredientes foram pesados, moídos, homogeneizados e na sequência as dietas foram extrusadas. Esta etapa (extrusão) foi realizada na Unidade Fabril da Premier Pet, Dourado – SP.

Tabela 1 - Formulação e composição química das dietas experimentais

Ingredientes (%)	DC	LSC 0,3	LSC 0,6
Amido	1,00	0,70	0,40
Leveduras	-	0,30	0,60
Milho grão	45,35	45,35	45,35
Farinha de vísceras de frango	30,08	30,08	30,08
Glúten de milho 60	9,39	9,39	9,39
Gordura de aves	9,21	9,21	9,21
Palatabilizante líquido	2,00	2,00	2,00
Palatabilizante em pó	0,50	0,50	0,50
Cloreto de potássio	0,43	0,43	0,43
Sal comum	0,35	0,35	0,35
Calcário	0,40	0,40	0,40
Premix min/vit ¹	0,50	0,50	0,50
Cloreto de colina 60%	0,40	0,40	0,40
Antifúngico	0,20	0,20	0,20
Antioxidante	0,04	0,04	0,04
Taurina	0,15	0,15	0,15
Nutrientes	DC	LSC 0,3	LSC 0,6
Matéria seca (%)	94,21	91,46	91,27
Valores corrigidos para matéria seca			
Proteína bruta (%)	34,50	32,80	33,24
Extrato etéreo em hidrólise ácida (%)	15,18	17,46	16,05
Fibra bruta (%)	2,02	2,41	2,53
Matéria mineral (%)	6,54	7,53	7,21
Extrativos não nitrogenados (%)	41,77	39,80	40,97
Cálcio (%)	1,13	1,39	1,30
Fósforo (%)	1,13	1,12	1,08
Energia bruta (kcal/kg)	4744	4567	4513

DC (Dieta controle); LSC 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos); LSC 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos);

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

A quantidade de alimento fornecida aos animais foi baseada na equação de predição da necessidade energética do *National Research Council* - NRC (2006) para gatos adultos em manutenção, calculada por $100 \times (PC)^{0,67} = \text{Kcal/dia.}$

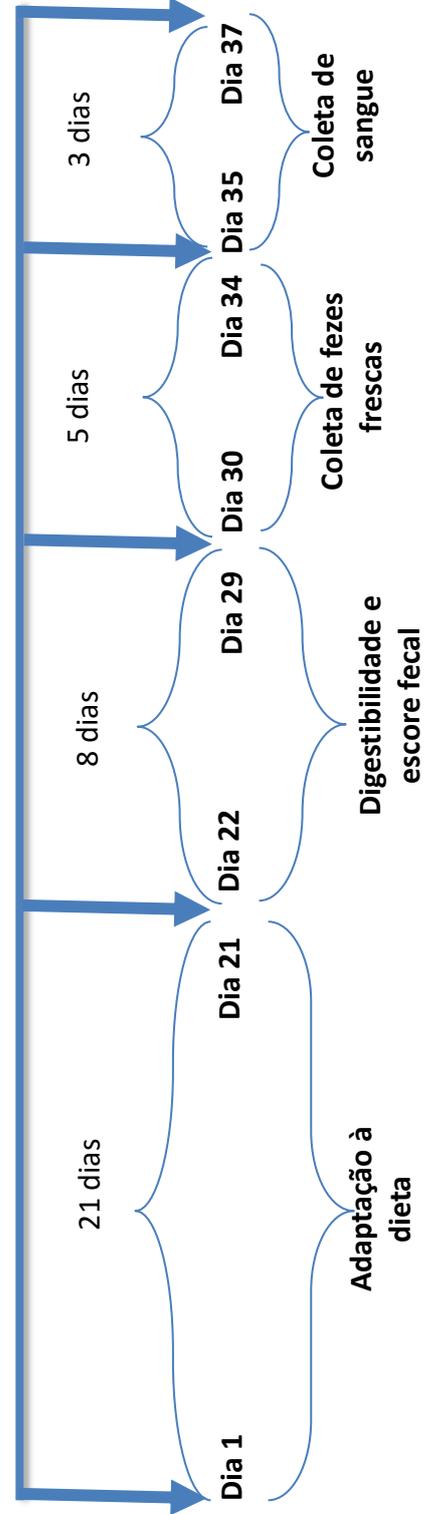
Quadro 1 - Descrição das fases experimentais

Dietas	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
	Adaptação à dieta	Digestibilidade e escore fecal	Análise microbiológica nas fezes	AGCC, AGCR, ácido láctico, nitrogênio amoniacal, aminas biogênicas e pH fecal	Teste de fagocitose e burst oxidativo, linfoproliferação, imunofenotipagem
DC	x	x	X	X	x
LSC 0,3	x	x	X	X	x
LSC 0,6	x	x	X	X	x

DC (Dieta controle); LSC 0,3 (dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos); LSC 0,6 (dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos); Etapa I: fase 1: 1° ao 21° dia; fase 2: 22° ao 29° dia; fase 3: e 4 30° dia; fase 5: 35° ao 37°. AGCC = Ácidos graxos de cadeia curta; AGCR = Ácidos graxos de cadeia ramificada.

Na figura 3 está ilustrado o esquema experimental.

Figura 3 – Esquema experimental



4.3 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e escore fecal

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2009). Dessa forma, o consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. As fezes foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento, durante oito dias. As fezes foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. Ao final do período de coleta, estas foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal e período (*pool* de fezes). Na sequência foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. As fezes pré-secas e as dietas foram então moídas em moinho tipo faca, com peneira de 16 mesh para proceder-se às análises laboratoriais.

Nas fezes e alimentos foram determinados, segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995), os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB), bem como a energia bruta dos alimentos, fezes e urina que será determinada em bomba calorimétrica, sendo as análises conduzidas em duplicata e repetidas quando variarem mais de 5%. Todas as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

O escore fecal foi determinado ao longo do período de coleta de fezes para a digestibilidade e foram atribuídas notas de 1 a 5 (DE-OLIVEIRA et al., 2008), sendo consideradas:

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

4.4 Determinação da concentração fecal de bactérias de interesse pela técnica de PCR em tempo real

Para a determinação da microbiota das fezes, amostras deste material foram coletadas de forma asséptica em até 30 minutos após a defecação, durante três dias consecutivos, e foram armazenadas em frascos de tampa rosqueável vedados com parafilme, os quais foram mantidos a -80°C . No momento da extração do DNA as amostras foram descongeladas e as fezes dos três dias foram homogeneizadas (*pool* de fezes) e divididas em alíquotas de três gramas em três tubos plásticos estéreis de tampa rosqueável, vedados com parafilme, sendo um tubo utilizado para extração do DNA e os demais armazenados a -80°C . Para extração do DNA foi utilizado o kit comercial QIAmp DNA STOOL Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo recomendações do fabricante, o qual servirá de molde na etapa seguinte de quantificação do DNA bacteriano. Todas as amostras de DNA foram verificadas quanto a sua pureza e integridade, sendo estocada a -80°C até seu uso. As reações de amplificação serão realizadas em duplicata e em volumes finais de $20\mu\text{L}$, constituídos de: $10\mu\text{L}$ de Master Mix SYBR® Green (Promega); $0,45\mu\text{L}$ de iniciador forward ($100\mu\text{M}$); $0,45\mu\text{L}$ de iniciador reverse ($100\mu\text{M}$) e $02\mu\text{L}$ de DNA. Como controle negativo foi utilizada água MiliQ ao invés de DNA, em todas as reações de amplificação, e como controle positivo cepas purificadas. Os iniciadores utilizados foram os seguintes: *Lactobacillus spp.* (WALTER et al., 2001; HEILIG et al., 2002; CARROLL et al., 2010), *Bifibobacterium spp.* (PENDERS et al., 2005), *Clostridium perfringens* (WANG et al., 1994) e *E. coli* – *Hafnia alvei* – *Shigella spp.* (MALINEN et al., 2003). Os ciclos de centrifugação (amplificação) foram analisados no programa NetPrimer (Premier Biosoft International) para verificar as condições ideais de ampliação, e as especificidades pelo programa BLAST (National Center for Biotechnology Information – NCBI). Todos os procedimentos acima descritos foram realizados no Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

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

Grupos	Iniciadores 5' → 3'	Amplicon (bp)	Referência
<i>Bifibobacterium spp.</i>	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	125	Penders et al. (2005)
<i>Lactobacillus spp.</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	341	Walter, Hertel e Tannock (2001); Heilig et al. (2002); Carroll et al. (2010)
<i>Clostridium perfringens</i>	AAAGATGGCATCATCATTCAAC TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	279	Wang et al. (1994)
<i>E. coli – Hafnia alvei – Shigella spp.</i>	GTTAATACCTTTGCTCATTGA ACCAGGGTATCTAATCCTGTT	340	Malinen et al. (2003)

4.5 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta, ramificada e ácido láctico

As amostras de fezes foram coletadas em até 30 minutos após a defecação. Após coletadas, foram homogeneizadas e pesadas, sendo que para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foram utilizadas três gramas das fezes acidificadas com 09mL de ácido fórmico a 16%. Para a determinação do ácido láctico, foi empregado mais três gramas das fezes diluídas em 09mL de água destilada. As misturas foram mantidas pelo prazo de sete dias em refrigerador, homogeneizadas diariamente, e posteriormente, centrifugadas por 15 minutos à 15°C em 5.000rpm, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C). A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada foi realizada por cromatografia gasosa (SHIMADZU, 2014) de acordo com Erwin et al. (1961), com detector de ionização de

chama, controlado pelo programa Shimadzu GC Solution e coluna de separação Stalbilwax de 30 metros e 0,53mm, gás hélio como carreador, nitrogênio como make up, oxigênio com regulagem manual e injetor e detector de chama à 250°C, e a temperatura da coluna mantida em 145°C. Para calibração foi utilizada solução de padrão externa com ácido acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico.

A amostra líquida, previamente centrifugada, foi injetada e vaporizada percorrendo, com auxílio do gás de arraste a coluna. Nesta coluna os ácidos vaporizados mais leves percorrem mais rapidamente a coluna, atingindo o detector de ionização de chama. Neste, a corrente formada pela ionização da chama com o ácido é coletada e enviada a um computador na forma de impulso elétrico. Este calcula a concentração da amostra e compara as áreas dos picos formados pela intensidade dessa corrente com a área dos picos formados pela solução contendo o ácido padrão. Desta forma, calcula-se a concentração da amostra através de uma regra de três simples.

O ácido láctico foi mensurado segundo metodologia descrita por Pryce (1969), pelo método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro (QUICK-Lab, DRAKE Eletrônica Comércio LTDA, São José do Rio Preto – SP). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

4.6 Determinação do pH fecal

A coleta das fezes para determinação do pH fecal foi realizada em até 30 minutos após a defecação dos animais. Sua determinação foi realizada por um peagâmetro digital de bancada (Digimed, DM-20, São Paulo/SP). Para tanto, foi realizada introdução direta do eletrodo em uma solução de 9:1 de água destilada e fezes, sendo pesados 02 gramas de fezes, as quais foram diluídas em 18mL de água destilada, e posteriormente mensurado pH da solução, conforme metodologia adaptada de Walter et al. (2005).

4.7 Determinação de aminas biogênicas

Para realizar as análises do perfil de aminas biogênicas nas fezes dos animais, foram coletadas 05 gramas de fezes frescas em duplicata, em até 30 minutos após a defecação, as quais foram conservadas em 07 mL de ácido tricloroacético a 5% e refrigeradas. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 20 minutos à 4°C, o sobrenadante filtrado em papel filtro qualitativo, e o resíduo extraído por mais duas vezes, empregando-se 07 mL e 06 mL de ácido tricloroacético a 5%. Os sobrenadantes foram combinados para posterior determinação das aminas biogênicas. Estas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por fluorimetria após derivação pós-coluna com oftalaldeído (VALE; GLÓRIA, 1997).

A identificação das aminas foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão. Os padrões de aminas empregados foram: dicloridrato de putrescina, dicloridrato de cadaverina, cloridrato de tiramina, dicloridrato de histamina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina), complexo sulfato creatinina agmatina, tricloridrato de espermidina, tetracloridrato de espermina, cloridrato de 2-feniletilamina e triptamina. A solução estoque foi preparada por diluição do padrão de cada amina separadamente em ácido clorídrico 0,1N, que resultou nas soluções padrão contendo 1mg/mL de cada amina. Em seguida, cada solução padrão foi transferida para balão volumétrico, formando uma solução com 10 aminas, conforme metodologia descrita por Figueiredo (2008). Todos os procedimentos para a determinação das aminas foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG.

4.8 Determinação de nitrogênio amoniacal nas fezes

Para determinação do nitrogênio amoniacal fecal, três gramas de fezes frescas (coletadas no máximo 30 minutos após a defecação) foram homogeneizadas e misturadas

com 09mL de ácido fórmico a 16%. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 5.000rpm durante 15 minutos a 15°C por três vezes, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento. Após a extração as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C). Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e em seguida alíquotas de 02mL diluídas em 13mL de água destilada e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio. A destilação foi realizada com 05mL de solução 0,2N de hidróxido de potássio, e a titulação com ácido clorídrico 0,005N, conforme Vieira (1980). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP.

4.9 Teste de fagocitose e *burst* oxidativo

Para a realização deste ensaio, leucócitos sanguíneos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) foram incubados com um reagente fluorescente que indica a produção de espécies reativas de oxigênio no estado basal e após a fagocitose de bactérias *S. Aureus* que indicará a porcentagem e intensidade de fagocitose. As células foram incubadas com o reagente DCFH-DA em PBS (tampão fosfato salina) e com DCFH e a *S. aureus* marcada com um fluorocromo (iodeto de propídeo) sendo mantidas a 37°C por 20 minutos. Após este período as hemácias foram rompidas com uma solução de lise e procedeu-se as lavagens com PBS até a obtenção de uma amostra de aspecto límpido que foi submetida a leitura em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (Becton & Dickinson).

4.10 Obtenção de linfócitos sanguíneos

O sangue periférico total foi diluído em tampão de fosfato (PBS) na proporção 1:1 sendo, em seguida, cuidadosamente transferido sobre a solução de Ficoll 1077g/dL (Amersham, USA) na proporção 2:1 e submetido à centrifugação de 400xG, sem break, durante 20 minutos a 23°C para a separação das células mononucleares. Após a

centrifugação, as células mononucleares foram coletadas da interfase (entre o plasma e o Ficoll) e lavadas por duas vezes, pela diluição em 10mL de PBS, seguida de centrifugação a 300xG, por 5 minutos a 4°C. O botão leucocitário foi ressuspenso em 1 mL de RPMI (Gibco) e uma alíquota de 10µL foi retirada para realizar a contagem do número de células viáveis. A essa alíquota foram adicionados 10µL de Azul de Tripán procedido de contagem em câmara de Neubauer para o ajuste celular em cada ensaio.

4.11 Teste de linfoproliferação

Os linfócitos sanguíneos marcados com o fluoróforo CFSE-DA foram semeados em triplicata na concentração de 5×10^4 células/ poço em placas de 96 poços de fundo em U com ou sem concanavalina A (5µg/mL) e de Fitohemaglutinina (10µg/mL) que são substâncias com potencial mitogênico em linfócitos T; as placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 40°C, por 48 horas. O CFSE se liga de forma covalente a moléculas intracelulares através da carboxifluoresceína, um corante fluorescente. Portanto, quando uma célula marcada com CFSE entra em divisão, a sua progênie carrega metade do número de moléculas marcadas com carboxifluoresceína e desta forma cada divisão celular consegue ser avaliada medindo-se a diminuição correspondente da fluorescência celular por citometria de fluxo. A entrada do corante na célula é mediada pela forma diacetilada do corante, o diacetato de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFDA, SE). O acetato faz com que o corante fique altamente permeável às membranas, permitindo seu fluxo rápido através da mesma. As esterases presentes na célula clivam os acetatos do CFDA, e, portanto, levam a formação do CFSE, que é muito menos permeável e conseqüentemente fica concentrado no interior celular (QUAH; PARISH, 2010). Ao final de 3 dias as células foram adquiridas por citometria de fluxo (FacsCalibur-BD) e analisadas pelo software FlowJo.

4.12 Imunofenotipagem de linfócitos

Foram avaliados o número de linfócitos T auxiliares (CD3/CD4+/CD45R-) e linfócitos T citotóxicos (CD3/CD8+/CD45R-) naives, linfócitos TCD45+ (linfócitos de

memória), de linfócitos B (CD21+) e a relação CD4/CD8. As células mononucleares (2×10^5 células/mL) foram incubadas em microtubos (1,5 mL) com o anticorpo CD3 (1:100), CD4 (1:10), CD8 (1:20), CD21 (1:100) e CD45R (1:100) (Anticorpo da Serotec, Biolegend e eBioscience), diluído em 100 μ L de tampão para citometria (PBS contendo 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Foram incluídos no ensaio os anticorpos isotípicos para definição da região negativa (background). As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C, protegidas da luz. Com o término do período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão para citometria em um volume de 1000 μ L/microtubo. Por fim as células foram ressuspendidas em 500 μ L de tampão fosfato. Foi selecionada como população de linfócitos a população de células com baixo tamanho (FSC) e baixa complexidade (SSC) de acordo com o gate delimitado. A partir dessa seleção foram determinadas as distintas populações de linfócitos. A aquisição e a análise de 10.000 células foram feitas pela técnica de citometria de fluxo. Todos os testes imunológicos (Teste de fagocitose e burst oxidativo, teste de linfoproliferação e imunofenotipagem de linfócitos) foram realizados no Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.13 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), sendo previamente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo teste F. As variáveis que não atenderam as premissas estatísticas sofreram transformação logarítmica ou raiz quadrada e então foi realizada análise de variância pelo PROC GLM do SAS com as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Dados que após as transformações e/ou retirada de *outliers* não apresentaram normalidade e/ou homogeneidade, foram então analisados por estatística não paramétrica pelo PROC NPAR1WAY do SAS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da inclusão de levedura com metabólitos ativos na digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta, microbiota, produtos da fermentação fecal e variáveis imunológicas de gatos adultos saudáveis. Na literatura, de forma geral, atribui-se aos prebióticos a capacidade de modular a microbiota intestinal, produção de AGCC e diminuição dos produtos da fermentação de origem proteica. Além disso, os moduladores da saúde intestinal parecem apresentar importantes efeitos no sistema imunológico. Gomes (2009) demonstrou que cães suplementados com até 0,45% de PCL obteve aumento de linfócitos T e B circulantes, sugerindo importante efeito imunológico. Porém em gatos, são escassos os estudos que utilizaram esses aditivos para avaliar a resposta imune. De modo geral, os estudos com prebióticos ainda apresentam resultados contraditórios, que parecem depender do indivíduo, ambiente, fonte prebiótica, dose e tempo de utilização.

No quadro 2 estão apresentados os principais resultados de pesquisa com prebióticos para cães e gatos publicados até o momento..

Quadro 2 - Resultados de pesquisas com o uso de prebióticos na digestibilidade dos nutrientes, microbiota e produtos da fermentação de cães e gatos

Autores		Espécie	Fontes		Principais resultados
Sparkers et al. (1998)	Gatos	FOS			Aumento em <i>Lactobacillus spp.</i> e <i>Bacteroides spp.</i> , seguido de redução em <i>E. coli</i> e tendência em <i>C. perfringens</i> .
Strickling et al. (2000)	Cães	XOS, FOS e PCL			PCL: Tendência à redução em ácido butírico ileal e em <i>Clostridium perfringens</i> fecal, seguido de aumento em ácido propiónico ileal em comparação às demais fontes (FOS e XOS). O grupo controle apresentou maior concentração ileal de ácido butírico em comparação ao FOS, MOS e XOS.
Hesta et al. (2001)	Gatos	Oligofrutose e Inulina			Ambos aditivos reduziram a digestibilidade aparente da proteína bruta e gordura. Inulina: Aumento na concentração fecal de AGCC.
Swanson et al. (2002)	Cães	FOS, PCL e FOS + PCL			PCL: Redução em aeróbios totais e tendência a redução na digestibilidade ileal. Tendência a aumento em <i>Lactobacillus spp.</i> FOS + PCL: Tendência à redução em anaeróbios totais.
Zentek, Marquat e Pietrzak (2002)	Cães	PCL, TGOS, Lactose e Lactulose			PCL: Redução na digestibilidade dos nutrientes e na excreção fecal de amônia.
Flickinger et al. (2003)	Cães	Frutanos (Inulina e FOS) e FOS			Frutanos: Redução na digestibilidade aparente dos nutrientes, tendência à redução na concentração fecal de amônia e tendência a aumento em AGCC. FOS: Tendência a aumento na digestibilidade ileal e redução linear na concentração de <i>C. perfringens</i> .
Propst et al. (2003)	Cães	Inulina e Oligofrutose			Oligofrutose: Aumento linear em aminas biogênicas. Inulina e oligofrutose: Redução nos coeficientes de digestibilidade aparente. Aumento em amônia e em determinados ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.
Grieshop et al. (2004)	Cães	Chicória, PCL e Chicória + PCL			PCL: Redução na concentração fecal de <i>E. coli</i> , aumento em <i>Bifidobacterium spp.</i> Chicória: Aumento de <i>Bifidobacterium spp.</i> e tendência a aumento da digestibilidade de gordura.
Apanavicius et al. (2007)	Cães	FOS e Inulina			Inulina: Aumento em AGCC e <i>Lactobacillus spp.</i> fecal.
Middelbos et al. (2007a)	Cães	Polpa de beterraba, celulose e blends (celulose + FOS + PCL)			Celulose: redução na digestibilidade aparente em comparação ao controle. Polpa de beterraba: aumento em <i>Bifidobacterium spp.</i> e determinados AGCC em comparação ao grupo controle. Blends: Redução da digestibilidade aparente e aumento em determinados AGCC.

Autores	Espécie	Fontes	Principais resultados
Middelbos et al. (2007b)	Cães	PCL	Comportamento cúbico na digestibilidade aparente de nutrientes e significativa redução linear e tendência a comportamento cúbico para <i>E. coli</i> , pelas técnicas de plaqueamento e PCR em tempo real, respectivamente. Tendência a comportamento cúbico para <i>C. perfringens</i> e <i>Lactobacillus spp.</i>
Barry et al. (2009)	Cães	FOS e Inulina	Inulina: Aumento linear na digestibilidade ileal e aparente, comportamento quadrático para os AGCC. FOS: Aumento linear na digestibilidade ileal e comportamento quadrático para digestibilidade aparente, bem como significância ou tendência quadrática em determinados ácidos graxos de cadeia curta e ramificada.
Gomes (2009)	Cães	PCL	Tendência a aumento em ácido butírico e comportamento variável em aminos biogênicas.
Aquino (2009)	Gatos	PCL	Aumento linear na digestibilidade aparente da matéria seca.
Barry et al. (2010)	Gatos	Celulose, FOS e Pectina	As fibras fermentáveis apresentaram elevação na concentração de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, amônia, aminos biogênicas, <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> e redução na digestibilidade aparente da proteína bruta e gordura, com comportamento variável dependendo da fonte de fibra quando comparadas à celulose.
Félix et al. (2010)	Cães	PCL	Redução da amônia fecal.
Faber et al. (2011)	Cães	GGMO	Aumento linear na digestibilidade aparente da matéria seca e concentração fecal de ácido acético, propiônico e AGCC total. Redução na digestibilidade aparente da proteína bruta e ácido butírico. Modulação em <i>Bifidobacterium spp.</i>
Kanakupt et al. (2011)	Gatos	FOS, GOS, FOS+GOS	FOS + GOS: Aumento em ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e redução na digestibilidade aparente da proteína bruta. FOS, GOS e FOS + GOS: Aumento na contagem fecal de <i>Bifidobacterium spp.</i>
Beloshapka, Wolff e Swanson (2012)	Cães	Polidextrose	Tendência à redução na digestibilidade aparente da proteína bruta. Redução em <i>C. perfringens</i> e aumento em AGCC.
Fischer et al. (2012)	Gatos	Polpa de beterraba, Fibra de cana de açúcar e Farelo de trigo	Todas as fontes reduziram a digestibilidade aparente dos nutrientes. Farelo de trigo: Aumento em ácido propiônico. Polpa de beterraba: Aumento em AGCC e ácido láctico
Santos (2015)	Gatos	PCL	Aumento linear de <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , ácido butírico e aminos biogênicas. Redução linear em <i>Clostridium perfringens</i> e quadrática no grupo <i>E. coli - Hafnia alvei - Shigella spp.</i>

FOS = frutoligosacarídeos; XOS = xiloligosacarídeos; PCL= parede celular de levedura; MOS = mananoligosacarídeos; AAGC = ácidos graxos de cadeia curta; GOS = galactoligosacarídeos; TGOS = transgalactoligosacarídeo; GGMO = galactoglucomanana.

A ingestão do alimento pelos animais foi adequada e estes mantiveram o peso constante durante o experimento ($4,29 \pm 0,89\text{kg}$), quando se utiliza gatos adultos em fase de manutenção não é interessante que o animal apresente perda ou ganho de peso, pois em condições experimentais as variações de peso e consumo podem alterar os resultados. Entre os tratamentos, os animais também não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a variável peso corporal ($4,13 \pm 0,80\text{kg}$).

Na Tabela 3 estão apresentados os dados de consumo de alimento em base de matéria natural, matéria seca e dos nutrientes, produção fecal, escore fecal e coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes que foram avaliados durante o período experimental.

Tabela 3 - Consumo de matéria natural, matéria seca e dos nutrientes, produção e escore fecal e coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes

Itens	Dietas ¹			EPM ²	P
	DC	LSC 0,3	LSC 0,6		
Consumo (gramas/dia)					
Matéria natural (MN)	64,04	66,77	61,23	2,9442	0,7684
Matéria seca (MS)	60,33	61,07	55,89	2,7341	0,7269
Matéria orgânica	60,09	62,82	57,20	2,7556	0,7321
Proteína bruta	20,81	20,24	18,58	0,9257	0,6173
Extrato etéreo	8,53	10,77	8,97	0,5024	0,1598
Fibra bruta	1,13	1,48	1,41	0,0707	0,1086
Matéria mineral	3,67	4,67	4,55	0,2162	0,1866
Extrativos não nitrogenados	25,20	24,56	22,90	1,1176	0,7067
Produção fecal					
Produção fecal (gramas/MN/dia)	25,61	27,77	24,76	0,4340	0,2499
Produção fecal (gramas/MS/dia)	7,22	9,10	7,87	1,8810	0,8085
Escore fecal	4,41	4,67	4,55	0,1216	0,6278
Coefficiente de digestibilidade aparente (%)					
Matéria seca	84,04	84,92	85,78	0,5449	0,3943
Matéria orgânica	87,38	87,82	87,82	3,3611	0,6771
Proteína bruta	87,42	88,35	87,60	0,4712	0,6313
Extrato etéreo	93,99	95,21	95,21	0,4571	0,3543
Fibra bruta	14,60 ^b	27,11 ^a	33,79 ^a	2,7357	0,0126
Matéria mineral	43,28 ^a	50,10 ^b	53,55 ^c	1,0574	<0,0001
Extrativos não nitrogenados	89,62	88,58	89,80	0,5157	0,5967
Energia metabolizável (kcal/g)	3,99 ^a	3,82 ^{ab}	3,71 ^b	0,0354	0,0330

¹DC= dieta controle; LSC 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LSC 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos; MS = matéria seca.

²EPM= erro padrão da média; significância p<0,05.

^{a,b,c} - médias na mesma linha sem uma letra em comum diferem pelo teste Tukey (p<0,05).

Pelos dados apresentados na tabela 3, pode-se verificar que não houve diferença significativa no consumo médio diário de matéria seca, matéria natural e dos nutrientes pelos

animais ($p>0,05$). A produção fecal na matéria natural, matéria seca e escore fecal também não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). Estes achados corroboram com Gomes (2009) e Santos (2015) que não observaram diferença significativa do consumo de matéria seca entre os tratamentos, quando utilizaram a PCL em três níveis crescentes de inclusão para cães e gatos respectivamente.

Em relação à produção fecal, Swanson et al. (2002) não encontraram diferença significativa com a inclusão do prebiótico MOS na dieta de cães, o que corrobora os resultados observados no presente estudo. Por outro lado, Gomes (2009) observou aumento linear da produção de fezes com a suplementação de PCL em cães e Middelbos et al. (2007b), ao utilizarem teores crescentes de PCL (0%; 0,05%; 0,25%; 0,45% e 0,65%) em cães, observaram comportamento quadrático para a produção fecal.

A inclusão do prebiótico não influenciou os CDAs da MS, PB, MO, EEHA e ENN ($p>0,05$). Para a fibra bruta observou-se digestibilidade superior nos tratamentos com levedura em relação ao grupo controle ($p=0,0126$), de forma semelhante à matéria mineral ($p<0,0001$), os animais que receberam o aditivo apresentaram maior digestibilidade que o controle, contudo o tratamento LSC 0,6 foi superior ao LSC 0,3, já em relação à energia metabolizável ($p=0,0330$) o tratamento controle foi superior ao LSC 0,6.

Resultados similares ao coeficiente de digestibilidade aparente da fibra bruta foram encontrados por Gomes (2009) que observou efeito quadrático, com a inclusão de 0,15% de PCL. Middelbos et al. (2007b), demonstraram efeito cúbico na digestibilidade da fibra insolúvel, com o maior coeficiente encontrado na inclusão de 0,25% de PCL. No presente estudo, a explicação para o aumento da digestibilidade da fibra pode ser devido a possível modulação da microbiota fecal por outros gêneros de bactérias que utilizam a fibra como fonte de energia, além disso, a análise de fibra bruta parece ser pouco específica, o que pode apresentar divergências. Este método é o mais antigo e ainda frequentemente utilizado, o seu resíduo é composto por várias quantidades de celulose, hemicelulose e lignina (VAN SOEST E MCQUEEN, 1973; DE-OLIVEIRA et al., 2012). Devido à solubilização substancial de polissacarídeos estruturais e lignina, esta análise apenas recupera fração incompleta dos componentes de hidrato de carbono fibroso, aproximadamente, 50 a 80% da celulose; 20% das hemiceluloses e de 10 a 50% das ligninas presentes no alimento (CUMMINGS, 1976; DE-OLIVEIRA et al., 2012).

Santos (2015) relatou aumento linear no coeficiente de digestibilidade aparente da material mineral, que foi justificado pela produção de ácidos orgânicos, ionização dos minerais, e consequente aumento em sua absorção, quando utilizaram a PCL em três teores crescentes de inclusão para gatos.

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

Tabela 4 - Valores médios de pH e concentração de ácido láctico, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada encontrados no estudo

Itens	Dietas ¹			EPM ²	P
	DC	LSC 0,3	LSC 0,6		
pH	6,00	5,94	6,08	0,0719	0,7559
Ácido láctico, µmol/kg de MS	1,36 ^a	3,42 ^b	4,24 ^b	0,5117	0,0040
Amônia, µmol/kg de MS	140,26	133,75	163,33	8,6888	0,2857
Ácidos graxos de cadeia curta, µmol/kg de MS					
Ácido acético	66,82	92,92	66,59	6,9453	0,2161
Ácido propiônico	32,47	27,08	30,38	2,9398	0,7819
Ácido butírico	24,50	40,29	24,84	5,3535	0,5446
Ácidos graxos de cadeia curta totais	123,79	160,29	121,81	11,5236	0,3292
Ácidos graxos de cadeia ramificada, µmol/kg de MS					
Ácido valérico	9,86	14,40	12,63	1,5584	0,5144
Ácido isobutírico	2,31	2,30	2,71	0,2085	0,6944
Ácido isovalérico	2,39 ^a	1,85 ^b	2,98 ^a	0,2520	0,0144
Ácidos graxos de cadeia ramificada totais	15,11	18,78	18,20	1,8400	0,6735

¹DC= dieta controle; LSC 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LSC 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos; MS = matéria seca.

²EPM= erro padrão da média; significância p<0,05.

^{a,b,c} - médias na mesma linha sem uma letra em comum diferem pelo teste Tukey (p<0,05).

Pelos dados apresentados na Tabela 4 pode-se verificar que não houve diferença significativa para o pH fecal, amônia, concentração fecal dos ácidos acético, propiônico,

butírico, AGCC totais, valérico, isobutírico e AGCR totais ($p>0,05$). Observou-se que o ácido láctico ($p=0,0040$) apresentou concentração superior nas fezes dos animais dos grupos que receberam LSC em comparação ao controle, já para o ácido graxo isovalérico ($p=0,0144$) LSC 0,3 diferiu dos demais tratamentos.

A inclusão da levedura no presente estudo não alterou pH fecal e AGCC ($p>0,05$), em contrapartida, Swanson et al. (2002) não observaram aumento na concentração de lactato nas fezes, porém aumento do pH fecal, justificado pela rápida absorção dos AGCC no cólon. Segundo Louis et al. (2007) e Bourriaud et al. (2005) diversas espécies bacterianas possuem capacidade de produzir acetato, butirato e propionato a partir do lactato, tendo como uma das explicações a formação do ácido láctico pelo *Bifidobacterium*, que é convertido em acetil-CoA, sendo via para síntese de ácido acético e precursor do ácido butírico. Há também relatos de que a bactéria *Roseburia spp.* possui a capacidade de produzir ácido butírico na presença de *Bifidobacterium adolescentis*, não pela conversão do lactato a butirato, mas pela hidrólise parcial dos substratos pela *Bifidobacterium adolescentis*, que facilitariam a ação da *Roseburia spp.* Quanto aos AGCC, estes resultados corroboram os encontrados por Swanson et al. (2002) e Zentek et al. (2002) ao avaliarem a suplementação de cães com um grama de MOS por quilograma de peso corporal ao dia, sem diferença significativa.

A amônia em altas concentrações pode ser prejudicial para a saúde de cães e gatos, produzida no cólon e absorvida através da parede do intestino. No ambiente intestinal, pode reduzir a altura dos vilos intestinais (WILLIANS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001), que prejudica a absorção dos nutrientes. Zentek et al. (2002) observaram redução da excreção fecal de amônia, em cães suplementados com MOS. No presente estudo, a concentração fecal de amônia não foi afetada com a inclusão do prebiótico.

O resultado encontrado neste estudo para o ácido isovalérico não corrobora os de Santos (2015) e Swanson et al. (2002), porém demonstra resposta interessante, já que os AGCR são oriundos da fermentação proteica, sendo estes indicativos da atividade de bactérias patogênicas, e houve redução na produção desse ácido no tratamento LSC 0,3, o que poderia sugerir melhor teor de inclusão para este parâmetro analisado.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados das concentrações fecais de aminas biogênicas encontrados no estudo.

Tabela 5 - Concentração de aminas biogênicas observadas no estudo

Itens	Dietas ¹			EPM ²	P
	DC	LSC 0,3	LSC 0,6		
	$\mu\text{mol/kg de MS}$				
Cadaverina	10,47	9,14	11,99	0,9367	0,4812
Espermidina	0,45	0,32	0,55	0,0482	0,1454
Histamina	1,57	1,24	1,25	0,2068	0,7114
Putrescina	4,75	4,72	6,07	0,6369	0,6028
Tiramina	3,81	4,97	5,70	0,5691	0,4641
Aminas biogênicas totais	21,03	20,41	25,56	1,9534	0,5188

¹DC= dieta controle; LSC 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LSC 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos; MS = matéria seca.

²EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$.

^{a,b,c} - médias na mesma linha sem uma letra em comum diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, pode-se verificar que não houve diferença significativa para a concentração fecal de cadaverina, espermidina, histamina, putrescina, tiramina e aminas biogênicas totais ($p > 0,05$). As aminas biogênicas agmatina, feniletilamina, serotonina e triptamina foram analisadas, entretanto não foram detectadas concentrações fecais destas nos animais.

A diminuição da concentração fecal de aminas pode ser benéfica à saúde gastrointestinal desses animais, assim como os AGCR, devido ao fato de serem produtos da fermentação proteica. Swanson et al. (2002) corroboram os resultados do presente estudo, estes autores não observaram diferença significativa entre as aminas biogênicas analisadas em cães suplementados com MOS. Em contrapartida, Gomes (2009) avaliou a inclusão de PCL em cães e encontrou redução nas aminas biogênicas tiramina, histamina, feniletilamina e triptamina. Por outro lado, Santos (2015) relatou aumento linear na concentração fecal das aminas putrescina, cadaverina, histamina e aminas biogênicas totais com a utilização de teores crescentes de PCL em gatos. Resultados encontrados na literatura em relação as aminas biogênicas em cães e gatos parecem ser variados de acordo com o prebiótico utilizado.

Para investigar a possível ação prebiótica da levedura utilizada no presente estudo na modulação da microbiota e correlacionar com os produtos de fermentação, alguns gêneros bacterianos foram analisados. Estes resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do PCR em tempo real relativo observados no estudo

Itens	Dietas ¹			EPM ²	P
	DC	LSC 0,3	LSC 0,6		
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1,00	1,62	0,89	1,72	0,8834
<i>Lactobacillus spp.</i>	1,00	0,62	0,52	0,90	0,3764
<i>Clostridium perfringens</i>	1,00 ^a	0,10 ^b	0,10 ^b	1,19	0,0226
<i>E. coli – Hafnia alvei – Shigella spp.</i>	1,00	0,70	0,40	1,12	0,4204

¹DC= dieta controle; LSC 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LSC 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos.

²EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$.

^{a,b,c} - médias na mesma linha sem uma letra em comum diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Pelos dados apresentados na Tabela 6 pode-se verificar que não houve diferença significativa para os gêneros bacterianos *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, e *E. coli – Hafnia alvei – Shigella spp* ($p > 0,05$). Já o gênero *Clostridium perfringens* ($p = 0,0226$) apresentou redução com a inclusão da levedura.

A modulação de *Clostridium perfringens* no presente estudo corrobora com os resultados encontrados por Strickling et al. (2000). Os autores relataram redução na população fecal de *Clostridium perfringens* de cães suplementados com MOS quando comparados com cães suplementados com xiloligossacarídeo (XOS) e FOS (5g/kg dieta). Santos (2015) observou redução linear em *Clostridium perfringens* e quadrática no grupo *E. coli - Hafnia alvei - Shiguella spp.*

Em contrapartida, Barry et al. (2010) encontraram aumento na concentração fecal nos gêneros bacterianos *Bifidobacterium spp.* e redução em *E. coli* em gatos suplementados com FOS. No mesmo estudo, gatos suplementados com pectina apresentaram aumento na concentração fecal de *Clostridium perfringens*, *E. coli* e *Lactobacillus spp.*

O gênero bacteriano *Clostridium* é constituído por espécies proteolíticas (KAMRA, 2005), que são bactérias responsáveis pela produção de compostos que em altas quantidades são tóxicos aos animais (aminas biogênicas, amônia, fenóis, AGCR etc). Entretanto, os ácidos

graxos de cadeia curta provenientes do metabolismo de espécies bacterianas sacarolíticas como *Bacterioides*, *Bifidobacterium* (TESHIMA, 2003), bactérias lácticas e *Eubacterium* (VANHOUTTE et al. 2005), possuem a capacidade de aumentar a produção de energia para o intestino, contribuir de forma positiva na digestão e metabolismo do hospedeiro, atenuar os efeitos nocivos dos produtos gerados pela degradação das proteínas, entre outros.

Ao se relacionar os resultados dos AGCC, AGCR e microbiota encontrados no presente estudo, é possível observar que houve redução do gênero bacteriano proteolítico (*Clostridium perfringens*) com a inclusão da levedura, que pode ter resultado em redução na produção do ácido isovalérico, oriundo da fermentação proteica, no tratamento LSC 0,3.

Foram realizadas análises de imunofenotipagem de linfócitos, teste de fagocitose, *burst* oxidativo e linfoproliferação, pois a modulação da microbiota pode influenciar no *status* imunológico desses animais. Estes resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da imunofenotipagem de linfócitos, teste de fagocitose, *burst* oxidativo e teste de linfoproliferação encontrados no estudo

Itens	Diets ¹			EPM ²	P
	DC	LSC 0,3	LSC 0,6		
CD4+ % (linfócitos T auxiliares)	24,76	28,85	26,44	1,5592	0,2614
CD8+ % (linfócitos T citotóxicos)	11,34	10,67	11,58	0,9517	0,9306
CD4+/CD8+	2,67	3,27	2,30	0,2731	0,2604
Burst oxidativo basal	255,63	211,00	256,29	15,8796	0,3720
<i>Burst</i> oxidativo induzido	1686,38	1754,00	1597,63	173,7762	0,9474
Índice de fagocitose	253,67	186,44	245,55	36,3965	0,7327
Concanavalina (ConA)	234,88	228,36	236,71	7,3403	0,9169
Fitohemaglutinina (PHA)	660,75	608,11	583,50	19,2171	0,2641

¹DC= dieta controle; LSC 0,3 = dieta controle com 0,3% de leveduras com metabólitos ativos; LSC 0,6 = dieta controle com 0,6% de leveduras com metabólitos ativos.

²EPM= erro padrão da média; significância $p < 0,05$.

^{a,b,c} - médias na mesma linha sem uma letra em comum diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Na Tabela 7 pode-se verificar que não houve diferença significativa para os linfócitos CD4+ e CD8+, relação CD4+/CD8+, *burst* oxidativo basal e induzido, índice de fagocitose e resposta proliferativa de linfócitos aos mitógenos concanavalina (ConA) e fitohemaglutinina (PHA) ($p > 0,05$).

Linfócitos são células com função de reconhecer antígenos estranhos e resposta imune, que possuem diversidade em populações celulares, com propriedades e funções distintas, como os linfócitos T envolvidos na resposta imune celular (TIZARD, 2002; GOMES, 2009).

Animais saudáveis alimentados com uma dieta de boa qualidade, completa e equilibrada não são susceptíveis a deficiências nutricionais, porém evidências recentes sugerem que a suplementação de ingredientes específicos podem modular o sistema imune, enquanto que a ingestão excessiva de outros nutrientes, podem resultar em imunodeficiência (BRADLEY; XU, 1996; LESSARD et al., 1997; CHANDRA, 1997; FIELD et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2012.; DE HEREDIA et al., 2012; RUTHERFURD-MARKWICK et al., 2013).

Rutherford-Markwick et al. (2013) encontraram aumento significativo de resposta proliferativa de linfócitos e aumento da atividade fagocitária periférica, em gatos alimentados com uma dieta suplementada com nucleotídeos derivados de levedura.

Na literatura inexistem trabalhos que avaliem resposta imunológica de gatos em dietas com inclusão de leveduras. Esperava-se que a inclusão do prebiótico poderia melhorar a resposta imune de animais alimentados com as leveduras, no entanto, esse efeito pode não ter sido encontrado por dificuldades em se estabelecer doses ótimas para efeito prebiótico, variações individuais dentro dos grupos experimentais e o próprio processamento do prebiótico utilizado.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a inclusão de levedura com metabólitos ativos, nos teores de inclusão avaliados, parece apresentar modulação benéfica da microbiota intestinal de gatos adultos, devido a redução em *Clostridium perfringens* e alteração da atividade metabólica da microbiota, com redução em ácido isovalérico no teor de inclusão de 0,3%.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, E. J.; SLOCOMBE, R. F. Flow cytometric studies of equine phagocytes following strenuous exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, p. 37-42, 1995.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- AQUINO, A. A. **Extrato seco de parede de levedura em dieta para gatos adultos**. 2009. 171 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- APANAVICIUS, C. J.; POWELL, K. L.; VESTER, B. M.; KARR-LILIENTHAL, L. K.; POPE, L. L.; FASTINGER, N. D.; WALLIG, M. A.; TAPPENDEN, K. A.; SWANSON, K. S. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from *Salmonella* challenge in weanling puppies. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1923-1930, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (ABINPET). **Faturamento do setor crescerá 7,4% e fechará em R\$ 17,9 bilhões em 2015**. [online], 2015. Disponível em <http://abinpet.org.br/site/faturamento-do-setor-crescera-74-e-fechara-em-r-179-bilhoes-em-2015/>. Acesso em: jan. 2016.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. AAFCO. **Official publication 2009**, Washington, 2009.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official and tentative methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995.
- BARRY, K. A.; HERNOT, D. C.; MIDDELBOS, I. S.; FRANCIS, C.; DUNSFORD, B.; SWANSON, K. S.; FAHEY Jr., G. C. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3244-3252, 2009.
- BARRY, K. A.; WOJCICKI, B. J.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER, B. M.; SWANSON, K. S.; FAHEY Jr., G. C. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978-2987, 2010.
- BARRY, K. A.; MIDDELBOS, I. S.; VESTER BOLER, B. M. V.; DOWD, S. E.; SUCHODOLSKI, J. S.; HERISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WHITE, B. A.; FAHEY JR.; SWANSON, K. S. Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 12, p. 5924-5933, 2012.
- BELL, E. T.; SUCHODOLSKI, J. S.; ISAIAH, A.; FLEEMAN, L. M.; COOK, A. K.; STEINER, J. M.; MANSFIELD, C. S. Faecal microbiota of cats with insulin-treated diabetes mellitus. **PLOS One**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 2014.

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

BELOSHAPKA, A. N.; ALEXANDER, L. G.; BUFF, P. R.; SWANSON, K. S. The effects of feeding resistant starch on apparent total tract macronutrient digestibility, faecal characteristics and faecal fermentative end-products in healthy adult dogs. **Journal of Nutrition Science**, v. 3, n. 38, p. 1-5, 2014.

BLAUT, Michael. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, v. 41, n. 1, p. 11-16, 2002.

BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. Fermentaciones alimentarias. **Microbiologia Alimentar**, Zaragoza, v. 2, p. 19-29. 1995.

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

BRADLEY, J.; XU, X. Diet, age, and the immune system. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. 43, 1996.

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

BUTOLO, J. E. Uso da levedura desidratada na alimentação de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Ed. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. Campinas, SP, p. 51-83, 1997.

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

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

CARVALHO, G. B. M.; DRAGONE, G.; BENTO, C. V.; SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Utilização da banana como adjunto na obtenção de mosto cervejeiro de alta densidade: um estudo para fim biotecnológico clássico inédito. In: **Congresso Mineiro de Propriedade Intelectual**, UFJF, Juiz de Fora, MG, 2006.

CARVER, J. D.; WALKER, W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **Nutritional Biochemistry**, New York, v. 6, p. 58-72, 1995.

CASTILHO, W.; KRONKA, R. N.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Efeito da substituição do farelo de soja pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) desidratada como fonte de proteína em dietas para leitões desmamados sobre peso de órgão digestivos e atividade das enzimas pancreáticas. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 12, n. 1, p. 12-20, 2004.

CHANDRA, Ranjit Kumar. Nutrition and the immune system: an introduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 460-463, 1997.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; VICENTE, E.; SILVA N.; ALVES, A. B.; MATTOS, J. A. R. Influência de frações da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre os índices séricos de glicose e lipídios, microbiota intestinal e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeias curtas de ratos em crescimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p. 338-348, 2007.

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

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAN, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 591, n. 1/2, p. 276-289, 2005.

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

CUMMINGS, J. H. What is fiber? In: A. S., Gene, J. A., Ronald (eds), **Fiber in Human Nutrition**. Plenum Press, New York, p. 1–30, 1976.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 02, p. 332-338, 2012.

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

DE-OLIVEIRA, L. D.; TAKAKURA, F. S.; KIENZLE, E.; BRUNETTO, M. A.; TESHIMA, E.; PEREIRA, G. T.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C. Fibre analysis and fibre digestibility in pet foods—a comparison of total dietary fibre, neutral and acid detergent fibre and crude fibre. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 96, n. 5, p. 895-906, 2012.

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

- DENG, P.; SWANSON, K. S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 6-17, 2015.
- DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. **Pediatria Prática**, v. 39, n. 7, p. 7-18, 1968.
- DIJKGRAAF, G. J. P.; LI, H.; BUSSEY, H. Cell- β -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VANDAMME, E. J.; De BAETS, S.; STEINBUCHER, A. (Ed.). **Biopolymers**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2002 .v. 6, p. 179-213.
- ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1768-1771, 1961.
- FABER, T. A.; HOPKINS, A. C.; MIDDELBOSS, I. S.; PRICE, N. P.; FAHEY JR., G. C. Galactoglucomannan oligosaccharide supplementation affects nutrient digestibility, fermentation end-product production, and large bowel microbiota of the dog. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 1, p. 103-112, 2011.
- FEGAN, D. F. et al. Functional foods for aquaculture: benefits of NuPro® and dietary nucleotides in aquaculture feeds. In: **Nutritional biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium**, Lexington, Kentucky, USA, 23-26 April 2006. Alltech UK, p. 419-432 , 2006.
- FÉLIX, A. P.; ZANATTA, C. P.; BRITO, C. B. M.; MURAKAMI, F. Y.; FRANÇA, M. I.; MAIORKA, A.; FLEEMING, J. S.; Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 31-35, 2010.
- FIELD, C. J.; JOHNSON, I. R.; SCHLEY, P. D. Nutrients and their role in host resistance to infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 1, p. 16-32, 2002.
- FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica aminas bioativas em ovos de consumo**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- FISCHER, M. M.; KESSLER, A. M.; SÁ, L. R. M.; VASCONCELLOS, R. S.; ROBERTI FILHO, F. O.; NOGUEIRA, S. P.; OLIVEIRA, M. C. C.; CARCIOFI, A. C. Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 7, p. 2233-2245, 2012.
- FLICKINGER, E. A.; SCHREIJEN, E. M. W. C.; PATIL, A. R.; HUSSEIN, H. S.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JR.; G. C. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 8, 2008-2018, 2003.
- FLEET, G. H. Cell walls. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: yeast organelles**. London: Academic Press. 1991. Cap. 5, p. 199-277.

- FLEMMING, J.S. **Utilização de leveduras, probióticos e mannanoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frango de corte.** 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom Knows Best: the universality of maternal microbial transmission. **PLOS Biology**, v. 11, n. 8, p. 1-9, 2013.
- GIBSON G. R., ROBERFROID M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.
- GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S1-4, 2002.
- GOMES, M. O. S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães.** 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2009.
- GOMES, M. O. S. **Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa gastrintestinal e imunidade de cães Beagle de diferentes grupos etários.** 2013. 103 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2013.
- GRIESHOP, C.; FLICKINGER, E.; BRUCE, K.; PATIL, A. R.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; FAHEY Jr., G. C. Gastrointestinal and Immunological responses of senior dogs to chicory and mannanoligosaccharides. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 6, p. 483-493, 2004.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.
- HEILIG, H. G. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 68, p. 114-123, 2002.
- HENDERSON, L. M.; MOULE, S. K.; CHAPPELL, J. B. The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1-2, p. 157-162, 1993.
- HESTA, M.; JANSSENS, G. P.; DEBRAEKELEER, J.; DE WILDE, R. The effect of oligofructose and inulin on faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 85, n. 5-6, p. 135-141, 2001.

HOFER, M.; POSPISIL, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 607-609, 1997

HUSSEIN, H. S.; FLICKINGER, E.A.; FAHEY JR., G. C. Petfood applications of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1454-1456, 1999.

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

INSTITUTO CUBANO DE PESQUISA DOS DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR (ICIDCA). **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, p. 474, 1999.

INOUE, K.; MINAMI, Y.; TAOKA, Y.; IKATA, T.; FUKUZAWA, K. Phagocytosis and superoxide generation in human polymorphonuclear leukocytes from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *Frontiers os Reactive Oxigen in Biology and Medicine* (eds Asaka, K. and Yoshikawa, T.) CRC Press: New York, 459-461, 1994.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; ABIRU, T.; WINSHIP, T.; KUCHAN, M. J. Dietary nucleotides modulate antigen-specific type 1 and type 2 t-cell responses in young c57bl/6 mice. **Nutrition**, v. 16, n. 6, p. 442-446, 2000.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n.1, p.124-135, 2005.

KANAKUPT, K.; VESTER BOLER, B. M.; DUNSFORD, B. R.; FAHEY Jr., G. C. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1376-1384, 2011.

KROLL, Fernanda Sant Anna. **Efeitos da adição de mananoproteínas derivadas da parede celular de leveduras sobre parâmetros imunológicos de cães adultos e idosos**. 2014. xii, 93 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

LEE, J. N.; LEE, D. Y.; Ji, I. H.; KIM, G. E.; KIM, H. N.; SOHN, J.; KIM, S.; KIM, C. W. Purification of Soluble β -Glucan with Immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience*, **Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 4, p. 837-841, 2001.

LESSARD, MARTIN; HUTCHINGS, DONNA; CAVE, N. A. Cell-mediated and humoral immune responses in broiler chickens maintained on diets containing different levels of vitamin A. **Poultry science**, v. 76, n. 10, p. 1368-1378, 1997.

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

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

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

MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; BOZA, J. J.; DEL PINO, J. I.; LUCENA, J.; MARTINEZ-VALVERDE, A.; GIL, A. Dietary nucleotides might influence the humoral immune response against cow's milk proteins in preterm neonates. **Neonatology**, v. 71, n. 4, p. 215-223, 1997.

MARTINS, M. S. **Leveduras de cerveja e cana-de açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), autolisada e íntegra, na dieta de cães**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2009.

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

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

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

MOREIRA, I.; MARCOS JÚNIOR, M.; FURLAN, A. C.; PATRICIO, V. M. I.; OLIVEIRA, G. C. Uso da levedura seca por “spray-dry” como fonte de proteína para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 31, p. 962-969, 2002.

MORRISON, M.; MACKIE, R.I. Biosynthesis of nitrogen-containing compounds. In: MACKIE, R.I.; WHITE, B.A. **Gastrointestinal microbiology**. New York: Chapman & Hall. cap. 12, p. 424-469, 1997.

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

NAVARRO, J.; RUIZ-BRAVO, A.; JIMÉNEZ-VALERA, M.; GIL, A. Modulation of antibody-forming cell and mitogen-driven lymphoproliferative responses by dietary nucleotides in mice. **Immunology letters**, v. 53, n. 2, p. 141-145, 1996.

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

PEREIRA, E.S. Fontes nitrogenadas e uso de *Saccharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilho: consumo, digestibilidade, balanço, nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 20, p. 563-572, 2001.

PEZZATO, L. E.; MENEZES, A.; MARROS, M. M.; GUIMARÃES, I. G.; SCHICH, D. Levedura em dietas para alevinos de tilápias do Nilo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 84-94, 2006.

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

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

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

QUAH, B. J. C.; PARISH, C. R. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 44, p. e2259-e2259, 2010.

RAMOS, G. R. V.; BIRCHAL, V. S.; SEARA, L. M.; PEREIRA, F. D.; ALVISI, P. Caracterização química do autolisado de levedura de alambique e avaliação da aceitabilidade do pão de queijo adicionado do autolisado desidratado. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 473-484, 2011.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105-110, 2002. Supplement, 2.

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

ROSSATO, S. B. **Níveis de histamina em diferentes vinificações**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centros de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

RUTHERFURD-MARKWICK, K. J.; HENDRIKS, W. H.; MOREL, P. C.; THOMAS, D. G.; The potential for enhancement of immunity in cats by dietary supplementation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 3, p. 333-340, 2013.

SANTOS, J. P. F. **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos**. 2015. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

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

SATYARAJ, E. Emerging paradigms in immunonutrition. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, p. 25-32, 2011.

SCHLEY, P. D.; FIELD, C. J. The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 221-230, 2002.

SCHWARTZ, E. A.; ZHANG, W. Y.; KARNIK, S. K.; BORWEGE, S.; ANAND, V. R.; LAINE, P. S.; SU, Y.; REAVEN, P. D. Nutrient modification of the innate immune response a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 4, p. 802-808, 2008.

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

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

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

SWANSON, K. S.; FAHEY JR., G. C. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. In: Falta autor do livros. **Recent advances in pet nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, p. 19-35, 2007.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: falta editora, p. 35-60, 2003.

THUM, C.; COOKSON, A. L.; OTTER, D. E.; McNABB, W. C.; HODGKINSON, A. L.; DUER, J.; ROY, N. C. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota

Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? **Journal of Nutrition**, 142, n. 11, p. 1921-1928, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 827, 2002.

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

VAN SOEST, P. J.; MCQUEEN, R. W. The chemistry and estimation of fibre. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 32, n. 03, p. 123, 1973.

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

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Valor nutritivo da biomassa de células integras, do autolisado e do extrato de levedura originaria de cervejaria. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 127-134, 2006.

WALKER, W. A.; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9. p. 668–675, 1998.

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

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

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

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

XIAO, Z.; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. β - Glucan enhancement of T cell IFN-gamma response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 315-320, 2004.

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