UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MELINA GOMES DA CRUZ

Detecção e enumeração de *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.
nas fezes de equinos recebendo dietas contendo níveis crescentes de

Farelo de Glúten de Milho 21

Pirassununga

2016

MELINA GOMES DA CRUZ

Detecção e enumeração de *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.
nas fezes de equinos recebendo dietas contendo níveis crescentes de
Farelo de Glúten 21

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dra. Roberta Ariboni
Brandi

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C955d Cruz, Melina Gomes

Detecção e enumeração de *Streptococcus* spp. e
Lactobacillus spp. nas fezes de equinos recebendo
dietas contendo níveis crescentes de Farelo de G...
/ Melina Gomes Cruz; orientador Roberta Ariboni
Brandi. -- Pirassununga, 2016.

48 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Microbiota equina. 2. coproduto. 3. nutrição.
I. Ariboni Brandi, Roberta, orient. II. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 74131 - 8614527 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Melina Gomes da Cruz no Programa: Zootecnia, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 16 dias do mês de setembro de 2016, no(a) Sala 14 do ZAZ realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Melina Gomes da Cruz, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Detecção e enumeração de *Streptococcus* ssp. e *Lactobacillus* ssp. nas fezes de equinos recebendo dietas contendo níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Roberta Ariboni Brandi	Presidente	FZEA - USP	<u>APROVADO</u>
Ricardo Luiz Moro de Sousa	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz	Titular	Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as): Pirassununga, aos 16 dias do mês de setembro de 2016.

Ricardo Luiz Moro de Sousa

Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz

Roberta Ariboni Brandi
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 20/09/2016 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Zootecnia - Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª. Drª. Rosemary Ap. de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

Como disse Augusto Cury: “Estamos vivendo em um mundo de informações desacompanhadas de conhecimento”. Agora digo, em um mundo em que tudo acontece em um único momento, espero poder aprender com calma. Aprender com quem coloca as emoções e sentimentos como partes fundamentais da construção da inteligência. Espero continuar a aprender o significado de paciência, como quem rega um jardim na certeza que cedo ou tarde ele vai florescer.

Melina Gomes 27-04-16

**Dedico este trabalho à uma amiga que hoje
“Vive em mim”
Patrícia de Moraes.**

Agradecimentos

Agradecimentos são sempre difíceis de escrever, afinal posso cometer o erro de me esquecer de alguém.

Obrigada as vezes parece ser uma palavra muito fraca perante a toda ajuda que algumas pessoas nos dão. Falo da ajuda no sentido de crescimento pessoal e profissional. Esta ajuda foi a que pude receber de muitas pessoas durante esse período em que estive estudando não somente na busca pelo título de mestre, mas na busca de aprender sempre mais.

As pessoas que conhecemos sempre nos ensinam alguma coisa e aqui quero ressaltar as que me ensinaram a ser melhor, a somar; quero falar das pessoas que tornaram meus dias mais leves e alegres durante todo o processo de aprendizagem.

Começarei agradecendo minha família, pela compreensão e apoio em minhas decisões e Deus por me mostrar a cada dia que sou capaz, e como sua filha mereço o melhor.

Agradeço imensamente ao meu marido e amigo Silvio. Por me refletir melhor do que julgo ser. Por me apoiar nas minhas escolhas e acreditar no meu potencial.

Agradeço a minha orientadora profa. Dra. Roberta Ariboni Brandi pela acolhida e por todo ensinamento e oportunidades que essa acolhida proporcionou. Muito obrigada por cada uma das milhares de vezes que teve que me corrigir, sei que tudo isso foi para um bem maior.

Agradeço ao pessoal do GPEEAC pelos momentos compartilhados, em especial as queridas Camila, Madalena, Thaís e ao Felipe, companheiro de aflições, assim como ao Roberlei e Kuel do setor de Equideocultura desta universidade pelo modelo de profissionalismo e a amizade construída e a Mikaele pela colaboração neste trabalho.

Agradeço imensamente ao pessoal do Laboratório de Higiene Zootécnica, em especial as amigas Marisa (nem sei como agradecer por tudo), Marcela, Andréia, Euder, Juliana, Anna, Carol, Marina, professora Andrezza, Sabrina, Juliana 2 (rs), Samara e as técnicas Silvia e Flávia, nem sei como agradecer por todos os momentos compartilhados, as risadas, enfim, por tudo.

Agradeço ainda a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior) pela concessão da bolsa e ao Laboratório de Bromatologia da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO).

Quero dedicar um agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo Moro pela amizade, compreensão, modelo de pessoa e professor a ser seguido. Aproveito a oportunidade para dizer o quão importante foi cada conversa, cada novo aprendizado, cada dúvida compartilhada e esclarecida da melhor forma possível. Modelo de respeito ao próximo. Tenho certeza que poderemos compartilhar dessa amizade sempre...

Agradeço a grande amiga Juliana Tischer, por toda trajetória juntas desde a graduação. Por todas as conversas e angústias compartilhadas, pela amizade e por somar tanta coisa boa na minha vida. Quero sempre ser et al. na sua vida amiga, afinal estou aqui pra colaborar com tudo. Amo vc.

Agradeço à minha amiga, que no meio dessa minha trajetória até aqui foi morar junto a Deus; tenho certeza que estaria feliz pela minha conquista. Obrigado por todo ensinamento e vida compartilhada, agradeço sempre Deus pela oportunidade de ter te conhecido.

Por fim, gostaria de agradecer as meninas da Rep. Gourmet pelas diversas risadas, momentos maravilhosos compartilhados como “Nossas Jantinhas”, Oli, Ma, Lolla e Fabi.

Todos fizeram parte do meu crescimento, da formação da pessoa que sou até aqui e que serei no futuro. Só tenho gratidão.

Melina

RESUMO

Com o objetivo de estudar as concentrações e espécies alvo de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. nas fezes de equinos recebendo dietas contendo níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21, foram utilizados quatro cavalos mestiços adultos, alojados em baias individuais, com idade média de 2,8 anos e pesando 445 (+/- 20) kg em manutenção, dispostos em quadrado latino. As dietas foram formuladas para atender à demanda de animais em manutenção, sendo 50% da energia proveniente do volumoso e 50% do concentrado, contendo os seguintes níveis de inclusão de farelo de glúten de milho 21: 0, 10, 20 e 30%. Foram calculadas as concentrações de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. nas fezes expressas em log₁₀ UFC/g (unidades formadoras de colônias por grama de fezes), e as espécies-alvo foram identificadas por Multiplex PCR e Multiplex PCR-RFLP, respectivamente para *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. Não foi observado efeito ($p>0,05$) das dietas sobre as populações dos gêneros. Das espécies-alvo do gênero *Lactobacillus*, quatro foram detectadas (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. delbruekii*, *L. acidophilus* e *L. gasseri*). Das espécies pesquisadas do gênero *Streptococcus*, foram detectadas os três grupos alvo: *S. bovis*/*S. infantarius*, *S. equinus* e *S. gallolyticus*. A inclusão de FGM 21 até o nível de 30% do concentrado não alterou a quantidade dos gêneros estudados no intestino grosso de equinos. A espécie de *Lactobacillus* predominante nas fezes de equinos recebendo dietas alta fibra foi *L. rhamnosus* e de *Streptococcus* foi *S. equinus*.

PALAVRAS-CHAVE: microbiota equina, coproduto, nutrição.

ABSTRACT

In order to study the concentrations and target species of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus* spp. in the feces of horses fed with increasing levels of Corn Gluten Meal 21 (CGM 21), four adult crossbred horses housed in individual stalls were used, with an average age of 2.8 years and weighing 445 (+/- 20) kg in maintenance, in a 4x4 latin square. The diets were formulated to meet the demands of the animals in maintenance, with 50% of energy from forage and 50% concentrate containing the following levels of corn meal 21: 0, 10, 20 and 30%. The concentrations of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus* spp. in feces were calculated and expressed in Log10 CFU/g (colony forming units per gram of feces) and the target species were identified by multiplex PCR and multiplex PCR-RFLP respectively for *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus* spp. There was no diet effect ($p > 0.05$) on the populations of genres of *Lactobacillus* and *Streptococcus*. Among the *Lactobacillus* studied, four species were detected: *L. rhamnosus*, *L. delbruekii*, *L. acidophilus* and *L. gasseri*. Also, three target groups of *Streptococcus* spp. were detected: *Streptococcus bovis*/*S. infantarius*, *S. equinus* and *S. gallolyticus* groups. The inclusion of CGM 21 to the level of 30% of the concentrate did not alter the amount of the microorganisms studied in the large intestine of horses. The species of *Lactobacillus* predominant in equine feces receiving high fiber diets was *L. rhamnosus* and of *Streptococcus* was *S. equinus*.

KEYWORDS: equine microbiota, coproduct, nutrition.

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição percentual dos concentrados experimentais.....	26
Tabela 2. Composição química dos concentrados e das dietas experimentais.....	27
Tabela 3. Primers utilizados nas reações multiplex PCR para <i>Lactobacillus</i> spp.....	30
Tabela 4. Primers utilizados nas reações de multiplex PCR para amplificação parcial do gene 16S rRNA do complexo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i> (SBSEC).....	31
Tabela 5. Padrões de banda após digestão pelas enzimas de restrição <i>Xba</i> I e <i>Mse</i> I.....	31
Tabela 6: População de <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i> expressos em Log ₁₀ UFC/g de fezes de cavalos recebendo dietas com níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21.....	33
Tabela 7. Distribuição das espécies de <i>Lactobacillus</i> spp. nas fezes de cavalos recebendo dietas contendo níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21 expressos em % de isolados identificados.....	34
Tabela 8. Distribuição das espécies de <i>Streptococcus</i> spp. nas fezes de cavalos recebendo dietas contendo níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21 expressos em % de isolados identificados.....	35
Tabela 9. Distribuição de bactérias dos gêneros <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i> nas fezes de cavalos recebendo dietas com níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21.....	35

Lista de Abreviações

AGCC- Ácidos graxos de cadeia curta

ATP- Adenosina trifosfato

BHI- Brain heart infusion

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DGGE- Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

EUA- Estados Unidos da América

FGM- Farelo de Glúten de Milho

g- grama

kg- quilograma

BAL- Bactérias Ácidos Láticas

mL- mililitro

µl- microlitro

ng- nanograma

pb- Pares de base

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

pH- Potencial de hidrogênio

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism

NRC- Nutrient Requirements Council of Horses

TAE- Tampão Tris-acetato

TGI- Trato gastrointestinal

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UV- Ultravioleta

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Características anatômicas e fisiológicas do trato digestório dos equinos	16
2.2 Alimentação de equinos	17
2.3 Uso de coprodutos na alimentação de equinos.....	18
2.4 Farelo de Glúten de Milho 21	20
2.5 Microbiologia do trato gastrointestinal equino	21
2.6 Técnicas moleculares utilizadas para determinar a diversidade microbiana	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	36
7. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	36
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
9. REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE.....	43

1. INTRODUÇÃO

Os equinos são herbívoros não ruminantes capazes de suprir sua demanda nutricional em grande parte ou na totalidade pela ingestão de forrageiras (BRANDI e FURTADO, 2009). O trato gastrointestinal desses animais contém uma densa e dinâmica população bacteriana (JULLIAND e GRIM, 2016; COSTA et al., 2012a), a qual faz com que eles consigam aproveitar a fibra da dieta de maneira semelhante ao que ocorre nos ruminantes devido a ação da microbiota presente principalmente no ceco e cólon (FRAPE, 2008).

Para a manutenção das concentrações energéticas das dietas, ingredientes com fibras de fácil fermentação vem sendo utilizados (DUREN, 2000), representados pelos coprodutos como a polpa cítrica (OTT et al., 1979; TRIBUCCI et al., 2013; MOREIRA et al., 2015) casca de soja (COVERDALE et al., 2004; KABE et al., 2016) e os coprodutos do milho, como o farelo de glúten de milho 21 (FGM 21) e gérmen de milho desengordurado (FRAPE, 2008).

O FGM 21 já foi estudado na dieta de diversos animais, dentre estes suínos em crescimento e terminação (NETO et al., 1995), ovinos (NEIVA et al., 2005) e frangos de corte (FREITAS et al., 2006). O FGM 21 é um coproduto da indústria do milho. Este ingrediente é resultado da extração da maior parte do amido e gérmen do grão de milho, através da separação e secagem das fibras durante o processo de moagem úmida, e enriquecido com água de maceração concentrada, e contém quantidades significativas de energia, proteína bruta, fibra digerível e minerais (BLASI et al., 2001).

São escassos trabalhos sobre a utilização do FGM 21 na alimentação de equinos. Frappe (2008) cita os alimentos à base de glúten de milho como constituintes úteis das misturas de alimentos para estes animais; contudo, não especifica a forma de utilização do coproduto.

A homeostasia no trato gastrointestinal equino é muito sensível a mudanças dietéticas. As alterações nos ingredientes constituintes das dietas podem ocasionar mudanças nas populações bacterianas (AL JASSIM e ANDREWS, 2009), dentre as quais podemos destacar as espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. (DE-FOMBELLE et al., 2003; DALY et al., 2012; COSTA et al., 2012b, MOREAU et al., 2014). Esse desequilíbrio na população microbiana pode levar a distúrbios como cólicas e laminite, os quais estão diretamente relacionados ao produto resultante da fermentação por essas bactérias, o ácido lático (PAGAN, 1998; RESPONDECK et al., 2007; HOFFMAN, 2009).

De-Fombelle et al. (2003) caracterizaram o perfil microbiano e bioquímico dos diferentes segmentos do trato gastrointestinal (TGI) de equinos recebendo uma dieta rica em

fibras e outra rica em cereais. As concentrações de *Lactobacillus* nas fezes foram de $7.5 \log_{10}$ UFC/mL na dieta rica em fibras e $7.4 \log_{10}$ UFC/mL na dieta rica em cereais. Já as concentrações de *Streptococcus* foram $7.4 \log_{10}$ UFC/mL e $7.8 \log_{10}$ UFC/mL para a dieta rica em fibras e rica em cereais, respectivamente. Concluíram que *Lactobacillus* e *Streptococcus* colonizam todo o trato gastrointestinal, porém um efeito da dieta só pode ser detectado no trato antes do ceco onde a concentração de *Lactobacillus* foi mais elevada no estômago e íleo e a concentração de *Streptococcus* foi maior somente no íleo dos cavalos da dieta rica em cereais.

Pesquisa semelhante foi realizada por Willing et al. (2009), os quais analisaram, através das fezes, as bactérias ácidos lácticas (BAL) de equinos submetidos a duas dietas diferentes, uma composta somente por forragem e uma suplementada com concentrado. Observaram que o número de BAL foi 10 vezes maior na dieta com concentrado quanto comparado ao detectado para os cavalos que receberam somente forragem.

Endo et al. (2007), avaliando a diversidade e composição do grupo *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* nas fezes de seis cavalos puro sangue de corrida saudáveis verificaram que *Lactobacillus equi* e *Lactobacillus johnsonii* foram predominantes em quase todas as amostras testadas e *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* foram predominantes dentro do grupo *Streptococcus*. Em termos quantitativos, as bactérias ácido lácticas superaram as Bifidobactérias nas fezes.

Pesquisas também foram realizadas no intuito de se avaliar as mudanças nessas populações microbianas em situações de sobrecarga de carboidratos ou laminite induzida (GARNER et al., 1978; AL JASSIM et al., 2005; MILINOVICH et al., 2008, 2010), como aquela realizada por Moreau et al. (2014), quando observaram através do fluído cecal que as populações de *Lactobacillus* subiram de 0,35%, da população total de bactérias nos animais controle, para 9,2% e 27,78% nos animais de laminite induzida por oligofrutose ou amido de milho, respectivamente, e as populações de *Streptococcus* subiram de 0,01% no grupo controle para 0,6% e 1,15% no grupo oligofrutose e amido de milho, respectivamente.

Apesar da importância da microbiota intestinal em cavalos, os estudos nessa área ainda são limitados quando comparados à microbiota dos ruminantes (COSTA et al., 2012a). Estudos de como essas populações se comportam perante a mudanças dietéticas são extremamente importantes, pois ajudam a elucidar os mecanismos de ação dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal equino (MILINOVICH, 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características anatômicas e fisiológicas do trato digestório dos equinos

O trato digestório dos equinos é dividido em boca, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso sendo que cada um desses compartimentos desempenha funções específicas na digestão e absorção dos nutrientes (FRAPE, 2008; MORGADO e GALZERANO, 2009;).

O estômago do cavalo ocupa cerca de 10% do trato digestório e é adaptado para recepção contínua de pequenas quantidades de alimento (FRAPE, 2008). É dividido em região aglandular, onde ocorre a fermentação sob a atividade de microrganismos resultando na produção de ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta e pequenas quantidades de gases (CO_2 , CH_4 e H_2), e uma região glandular onde são secretados ácido clorídrico, pepsina, hormônio polipeptídico e gastrina (FRAPE, 2008; BRANDI e FURTADO, 2009). Na região glandular ocorre o início da digestão da proteína pela liberação desses compostos e a secreção de suco gástrico é contínua, porém essa secreção diminui gradualmente conforme o estômago se esvazia; nesse momento, o pH dessa região está por volta de 1,5 a 2,0. O pH aumenta durante a refeição devido ao poder tamponante da saliva (FRAPE, 2008).

O intestino delgado (ID) do cavalo é relativamente curto, correspondendo a cerca de 30% do trato digestório (BRANDI e FURTADO, 2009). No intestino delgado, os nutrientes como açúcar, amido, lipídios e proteínas são digeridos através de enzimas pancreáticas e das células epiteliais da mucosa, e são absorvidos. (MEYER, 1995; FRAPE, 2008).

O intestino grosso representa cerca de 60% do trato digestório e é dividido em ceco, cólon, que é subdividido em cólon ventral direito e esquerdo, cólon dorsal direito e esquerdo e cólon distal, e reto (MEYER, 1995). Os segmentos do cólon estão conectados por dobras que são conhecidas como flexuras. Essas flexuras possuem a característica de demarcar a mudança na população microbiana de região para região (BRANDI e FURTADO, 2009). Neste compartimento ocorre principalmente a digestão dos carboidratos estruturais da parede celular das forrageiras através da fermentação microbiana (MORGADO et al., 2009).

Segundo Lewis (2000), os microrganismos presentes no ceco e no cólon, degradando a fibra dos alimentos para seu próprio metabolismo, convertem a fibra em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e ácido lático, os quais são absorvidos, fornecendo de 30 a 70% das necessidades de energia total nos equinos

dependendo do teor de fibra, assim como carboidratos solúveis ou amido contido na dieta (JULLIAND et al., 2001).

2.2 Alimentação de equinos

As exigências energéticas dos equinos podem variar devido a fatores como: condições ambientais, as funções e atividades do animal, intensidade e duração do exercício e fases da vida (LEWIS, 2000). O consumo de alimentos pelos animais adultos em geral representa entre 1,5 e 2,5% do seu peso vivo em base de matéria seca. Animais em crescimento e fêmeas em lactação consomem em média 3,2% do seu peso vivo (NRC, 2007).

A principal fonte de energia química que está prontamente disponível nas células é a adenosina trifosfato (ATP). O ATP é gerado nas células, a partir do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. A maioria dos carboidratos da dieta equina são originários de forragens, grãos e alguns coprodutos (NRC, 2007). Os carboidratos não estruturais são digeridos através das enzimas pancreáticas e das células epiteliais da mucosa intestinal, fornecendo grande parte da energia para os equinos. Já os carboidratos estruturais são digeridos pelas bactérias do trato gastrointestinal, que possuem as enzimas capazes de quebrar as ligações β que os constituem (LEWIS, 2000).

Hoffman et al. (2001) propuseram a análise dos carboidratos em três frações, visto que a proposta de Van Soest (1994), que dividia os carboidratos apenas em fibrosos e não-fibrosos, é mais adequada à fisiologia digestiva dos ruminantes devido às diferenças importantes no processo de digestão entre as espécies. Este fato deve-se à diferença na compartimentalização do trato digestório, resultando em variações na digestibilidade dos alimentos (KRONFELD, 2001; NRC, 2007). A análise proposta por Hoffman et al. (2001) consiste em três frações como já mencionado, sendo uma de carboidratos hidrolisáveis, composta por açúcares e amido não resistente hidrolisados no intestino delgado, uma fração dos carboidratos rapidamente fermentáveis como frutanas, substâncias pécicas além do amido resistente, e uma fração dos carboidratos lentamente fermentáveis representada pela fibra em detergente neutro, mais especificadamente, hemicelulose e celulose fermentados no intestino grosso gerando AGCCs. Os produtos da fermentação são, no caso dos rapidamente fermentáveis, principalmente lactato e propionato e, dos lentamente fermentados, acetato e butirato principalmente (HOFFMAN, 2003).

A alimentação dos equinos está baseada na relação entre volumoso e concentrado, que varia de acordo com as exigências nutricionais de cada categoria (FURTADO et al., 2011). As forragens são alimentos essenciais, não somente pelos nutrientes que fornecem, mas também pelo efeito estimulatório no tônus muscular do trato gastrointestinal, pois as fibras nelas presentes, não permitem uma rápida queda no pH do conteúdo do intestino grosso (ANDRIGUETTO et al., 1983; LEWIS, 2000).

O milho, o farelo de soja e o farelo de trigo são os principais ingredientes utilizados na formulação de concentrados (FURTADO et al., 2011). Outros ingredientes também são comumente utilizados como a aveia, farelo de arroz e centeio (LEWIS, 2000). A substituição de grãos do concentrado ricos em amido por ingredientes alternativos, como os coprodutos: casca de soja, polpa cítrica e os coprodutos do milho vem sendo estudados (MANZANO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; NEIVA et al., 2005; ARRUDA et al., 2009; BRANDI e FURTADO, 2009), pois diminuem o aporte de amido no intestino grosso (LINDBERG e KARLSSON, 2001). Esses coprodutos de forma geral apresentam maiores concentrações energéticas, fato atribuído à elevada quantidade de fibras de fácil fermentação e baixa lignina, estando, portanto, mais disponíveis à ação dos microrganismos (DUREN, 2000).

Fontes de proteínas também são essenciais na dieta equina, sendo que as fontes mais ricas oferecidas em proteínas vegetais são: os resíduos de sementes de oleaginosas e forrageiras secas de alta qualidade, particularmente a alfafa. Os farelos de sementes de oleaginosas são melhores fontes de proteínas quando comparado aos cereais, deve-se levar em conta também que seu equilíbrio de aminoácidos é superior (FRAPE, 2008).

2.3 Uso de coprodutos na alimentação de equinos

Para a manutenção das concentrações energéticas, ingredientes com fibras de fácil fermentação vindo sendo incluídos nas dietas (DUREN, 2000). Com isso, os coprodutos da agroindústria são fonte de interesse para pesquisadores e produtores (QUADROS et al., 2004).

Pesquisas com coprodutos buscando a possibilidade de uso na formulação de concentrados vem sendo realizadas (MANZANO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; ARRUDA et al., 2009; BRANDI et al., 2014; MENEZES et al., 2014). Estes coprodutos podem substituir os grãos comumente utilizados, os quais são ricos em amido e estão relacionados a distúrbios fermentativos no intestino grosso (LINDBERG e KARLSSON, 2001; FURTADO et al., 2011). Dentre os coprodutos de destaque na nutrição de equinos pode-se citar a polpa cítrica,

casca de soja (FURTADO et al., 2011) e os coprodutos do milho, como o farelo de glúten de milho 21 e gérmen de milho desengordurado (FRAPE, 2008).

Manzano et al. (1999), testando três níveis de substituição de milho por polpa cítrica (0, 7,5 e 15%), observaram que a polpa cítrica pode ser utilizada em até 15% do concentrado sem causar efeito deletério no crescimento de potros.

Menezes et al. (2014) avaliaram o efeito dos níveis de inclusão de polpa cítrica sobre os parâmetros sanguíneos de equinos (albumina, triglicérides, colesterol, glicose, insulina e ácidos graxos de cadeia curta) e observaram que não houve efeito da dieta sobre os parâmetros avaliados, bem como não houve efeito do tempo de coleta sobre as variáveis ácidos graxos de cadeia curta, colesterol, triglicérides e albumina; notou-se apenas efeito quadrático para as concentrações de glicose e insulina, sugerindo que a polpa cítrica pode ser incluída com o nível de até 28% em concentrados para equinos.

A digestibilidade aparente dos nutrientes e das frações de carboidratos das dietas com diferentes níveis de inclusão de polpa cítrica no concentrado (0, 7, 14, 21 e 28%) para equinos foi testada por Brandi et al. (2014), observando que a polpa cítrica pode ser adicionada em até 28% do concentrado sem causar efeito deletério sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta.

Testando a palatabilidade de dietas à base de polpa cítrica para equinos, Tribucci et al. (2013) observaram que houve efeito sobre a primeira ação, uma vez que 80% dos animais se alimentaram prontamente do concentrado e apenas 20% cheiravam-no antes da escolha; sugeriram uma inclusão inferior a 7% no concentrado, quando o mesmo for à base de milho, farelo de trigo ou farelo de soja.

Kabe (2013) avaliou o efeito da inclusão de níveis crescentes de casca de soja (0, 7, 14, 21 e 28%) no concentrado para equinos sobre a palatabilidade, digestibilidade aparente e qualidade das fezes e não observaram efeito deletério sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta, sobre a palatabilidade dos concentrados e sobre as características físico-químicas das fezes, sugerindo que a casca de soja pode ser incluída em dietas para equinos com o nível de inclusão de até 28%.

Quadros et al. (2004), avaliando a digestibilidade aparente e desenvolvimento de equinos em crescimento submetidos a dietas compostas por diferentes níveis de substituição do feno de Tifton 85 pela casca de soja, concluíram que as dietas para equinos podem ser formuladas com substituição total do feno de Tifton 85 pela casca de soja, sem afetar seu desempenho.

2.4 Farelo de Glúten de Milho 21

O Farelo de Glúten de Milho (FGM) 21 é um coproduto da indústria do milho, sendo resultado da extração da maior parte do amido e gérmen do grão de milho, através da separação e secagem das fibras, durante o processo de moagem úmida, e enriquecido com água de maceração concentrada. Aproximadamente, 11% do milho original processado transforma-se no coproduto que apresenta quantidades significativas de energia, proteína bruta, fibra digestível e minerais (BLASI et al., 2001). É um ingrediente com teor de fibra de cerca de 42% com elevada concentração de hemicelulose e baixa de celulose e lignina, sendo o teor de amido de 22,5% (KREHBIEL et al., 1995). A composição final deste produto pode variar dependendo das condições de cada indústria (HONEYMAN e ZIMMERMEN, 1990; KAWAUCHI, 2008).

Neiva et al. (2005) testaram cinco concentrados contendo 0, 20, 40, 60 e 80% de inclusão de farelo de glúten de milho em dietas à base de feno Tifton (*Cynodon sp.*) para ovinos em confinamento, avaliando consumo de matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro, bem como os ganhos de peso e a conversão alimentar. Observaram que a medida que se aumentou o nível de inclusão desse coproduto nas rações, a produtividade desses animais foi afetada negativamente. Danos à eficiência produtiva também foram detectados por Neto et al. (1995), ao testarem o farelo de glúten de milho para suínos em crescimento e terminação onde o produto substituiu 0, 15, 30, 45 e 60% da proteína bruta da dieta. O ganho de peso, consumo de ração e a conversão alimentar diminuíram linearmente com o aumento nos níveis de inclusão do produto, não devendo ser utilizado para suínos em crescimento e terminação.

Entretanto, pesquisa realizada por Freitas et al. (2006), avaliando o efeito da substituição parcial do milho e do farelo de soja em rações por níveis crescentes de farelo de glúten de milho 21 (Refinazil[®]) de 0, 5, 10 e 15% sobre o desempenho produtivo de frangos de corte, concluíram que este ingrediente pode ser incluído em até 15% sem prejuízo no desempenho desses animais.

Macedo et al. (2003), avaliando a substituição da proteína do farelo de soja pela proteína da farinha de glúten de milho nos níveis de 0, 10, 30 e 50% (base na proteína bruta) na produção e composição do leite, consumo voluntário e níveis de uréia plasmática de cabras leiteiras, observaram que não houve efeito sobre o consumo de matéria seca, porém houve decréscimos lineares na produção de leite, teor de gordura e teor de sólidos totais. Os teores de proteína bruta, lactose e sólidos totais não sofreram efeito dos níveis de substituição e os níveis de uréia plasmática foram inferiores para os menores níveis de substituição.

São escassos na literatura trabalhos sobre a utilização do FGM 21 na alimentação de equinos. Frape (2008) cita os alimentos à base de glúten de milho como constituintes úteis das misturas de alimentos para equinos, porém não especifica a forma de utilização do coproduto, bem como níveis de inclusão na dieta.

2.5 Microbiologia do trato gastrointestinal equino

Estudos relacionados à microbiota gastrointestinal em diversas espécies animais e no ser humano têm colaborado para a compreensão dos processos digestivos e o melhor conhecimento de algumas doenças metabólicas, incluindo processos inflamatórios (BAUER et al., 2006; CARICILLI et al., 2011). Em animais de produção, alterações na composição da dieta podem levar a mudanças significativas na ecologia microbiana gastrointestinal, concorrendo para a queda de produtividade destes animais (CALLAWAY et al., 2010). Dentre os animais, podemos destacar os equinos, os quais são alvos de pesquisas sobre a microbiota intestinal (MUHONEN et al., 2009; SHEPHERD et al., 2012; COSTA et al., 2015b; PHILIPPEAU et al., 2015; COVERDALE, 2016).

Apesar da importância da microbiota intestinal em cavalos, os estudos nessa área ainda são limitados quando comparados à microbiota dos ruminantes. Definir e estudar essas populações e suas funções específicas ainda é um desafio frente a sua complexidade (COSTA et al., 2012a).

Existe uma abundância de microrganismos que colonizam todo o TGI dos equinos como fungos, bactérias, protozoários e arqueas (CUMMINGS e MACFARLANE, 1997; FRAPE, 2008); com isso, pesquisas têm sido realizadas para fornecer informações sobre populações alvo específicas (DE-FOMBELLE et al., 2003; AL JASSIM et al., 2005; HARLOW et al., 2015).

Dentro da comunidade microbiana equina, podemos destacar as bactérias pertencentes ao grupo de produtoras de ácido láctico (BAL). As BAL são um grupo morfológicamente heterogêneo, com bacilos e cocos, sendo que estes últimos podem estar dispostos individualmente ou em cadeia. O produto final da fermentação dos açúcares por essas bactérias é o ácido láctico (SILVA, 2011).

Os mais importantes gêneros das BAL são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998), sendo *Lactobacillus* e *Streptococcus* os gêneros mais

isolados no trato gastrointestinal de equinos (MOREAU et al., 2014; AL JASSIM et al., 2005; DE-FOMBELLE et al., 2003). *Lactobacillus* são bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos com formato de bacilos. São estritamente fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbias. As espécies desse gênero possuem necessidades nutricionais complexas: precisam de meios ricos em carboidratos, aminoácidos, vitaminas entre outras substâncias para seu crescimento. São catalase-negativas, porém uma pseudo-catalase é formada em estirpes de *L. mali*. São encontrados em locais contendo ricas concentrações de carboidratos disponíveis, tais como membranas mucosas, intestino do homem e de animais. Podem ser homofermentativas, onde a produção de ácido láctico corresponde a mais de 85%, ou heterofermentativas, que além da produção de ácido láctico produzem ainda CO₂, etanol (e/ou ácido acético) em quantidades equimolares (WOOD e HOLZAPFEL, 1995).

Os *Streptococcus* possuem a forma de cocos. São gram-positivos e podem ser arranjos em cadeias ou aos pares. Estes microrganismos não produzem a enzima catalase (RUOFF et al., 1999). São anaeróbios facultativos, e a necessidade de CO₂ durante o período de crescimento é variável entre as diferentes espécies. É pela fermentação que a glicose e outros carboidratos são metabolizados, sendo o ácido láctico o principal produto final deste metabolismo (RUOFF et al., 1999). Estes microrganismos não produzem endósporos e são considerados não-móveis (KILIAN, 2005)

Esses gêneros são comumente utilizados como indicadores do funcionamento do trato gastrointestinal equino, pois o desequilíbrio nessas populações pode causar danos à saúde animal, como o aumento da fermentação gerando excessivas quantidades de ácido láctico e consequentemente cólicas e laminite (GARNER et al., 1975; DE-FOMBELLE et al., 2001; AL JASSIM et al., 2005; CRAWFORD et al., 2007; AL JASSIM e ANDREWS, 2009).

Algumas espécies desses gêneros são também denominadas como probióticas (GUPTA e GARG, 2009). Probióticos são microrganismos que produzem efeitos benéficos no hospedeiro. Seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente esclarecidos, embora sugere-se que estão diretamente relacionados à saúde do trato gastrointestinal, sendo utilizados como promotores de crescimento, no tratamento de doenças e como imunoestimulantes (COPPOLA e TURNES, 2004). Um dos mecanismos de ação seria a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação (CROSS, 2002). A ordem *Lactobacillales* possui a maioria das bactérias produtoras de ácido láctico comumente utilizadas como probióticos (COSTA et al., 2012a; SCHOSTER et al., 2014).

As populações microbianas nos diversos compartimentos do TGI diferem-se entre si. Na região fúndica do estômago onde o pH é ácido (mais ou menos 5,4) estão presentes

normalmente de 10^8 a 10^9 bactérias/g, sendo as mais presentes *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Veillonella gozogenes* (FRAPE, 2008). Estudos sobre a população microbiana presente no estômago isolaram as bactérias *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius* na porção esofágica (YUKI et al., 2000) e na região fúndica, mais anaeróbica, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus salivarius* (AL JASSIM et al., 2005).

De-Fombelle et al. (2003) caracterizaram o perfil microbiano e bioquímico dos diferentes segmentos do trato digestivo de equinos recebendo duas dietas, uma rica em fibras e a segunda rica em cereais; concluíram que *Lactobacillus* e *Streptococcus* colonizam todo o trato gastrointestinal, porém um efeito da dieta só pode ser detectado na porção anterior ao ceco onde a concentração de *Lactobacillus* foi mais elevada no estômago e íleo e a concentração de *Streptococcus* foi maior somente no íleo dos cavalos da dieta rica em cereais.

Mackie e Wilkins (1988) enumeraram a microbiota bacteriana anaeróbica do trato gastrointestinal de equinos e demonstraram que as mucosas e o lúmen do duodeno, jejuno e íleo continham entre 10^6 e 10^7 bactérias viáveis por mL, sendo que a maioria possuíam atividade proteolítica. *Streptococcus* também foram isolados em concentrações de 10^6 e 10^9 UFC/mL (DE-FOMBELLE et al., 2003).

Streptococcus bovis e *Streptococcus equinus* parecem ser as bactérias produtoras de ácido láctico predominantes no intestino grosso dos cavalos; ambas são homofermentativas, produzindo apenas L-lactato (ROWE et al., 1994; AL JASSIM e ROWE, 1999).

O ceco e cólon possuem as maiores quantidades de bactérias, podendo atingir, em animais que estão alimentados, $0,5 \times 10^9$ a 5×10^9 células/g de conteúdo (FRAPE, 2008). No ceco, estão presentes principalmente bactérias amilolíticas, celulolíticas, glicolíticas, hemicelulolíticas, bactérias produtoras e utilizadoras de lactato e proteolíticas (MACKIE e WILKINS, 1988; AL JASSIM et al., 2005).

De acordo com Julliand et al. (2001), no intestino grosso existe abundância na população de bactérias celulolíticas, aproximadamente 10^4 a 10^7 UFC/mL. O ceco quando comparado ao cólon exibe a maior concentração, indicando que o ceco é provavelmente o principal sítio de digestão de fibras. O conhecimento das bactérias que digerem as várias frações da fibra dos alimentos em equinos ainda é escasso (BRANDI e FURTADO, 2009).

As BALs isoladas no intestino grosso de equinos incluem *Lactobacillus delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. mucosae*, *L. equi*, *L. equigenersi*, *L. hayakitensis*, *L. buchneri*, *L. vitulinus*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* e *L. reuteri* (MOROTOMI et al., 2002; AL JASSIM et al., 2005; MORITA et al., 2007; MORITA et al., 2009).

Milinovich et al. (2008) avaliaram as mudanças populacionais bacterianas que ocorrem no ceco equino durante todo o curso da laminite induzida por oligofructose. Os dados mostraram que, dentro das espécies de *Streptococcus* spp. no intestino grosso de equinos, o *S. lutetiensis* é o microrganismo predominante que prolifera antes do início da laminite, utilizando oligofructose para produzir grandes quantidades de lactato. Concluíram ainda que se esses *Streptococcus* são lisados, componentes celulares libertados podem iniciar a laminite.

Alterações dietéticas, como o aumento no consumo de concentrado com altos níveis de carboidratos, podem criar condições favoráveis para o desequilíbrio da ecologia microbiana cecal e colônica (GARNER et al., 1977,1978; AL JASSIM et al., 2005; AL JASSIM e ANDREWS, 2009). Esse desequilíbrio e o aumento da fermentação microbiana podem provocar cólicas (SHIRAZI-BEECHEY, 2008). Os mesmos fatores são apontados como importantes no desenvolvimento de laminite; portanto, estudos de como essas populações microbianas agem perante a mudanças dietéticas são extremamente importantes, pois ajudam a elucidar os mecanismos de ação dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal equino (MILINOVICH, 2006).

2.6 Técnicas moleculares utilizadas para determinar a diversidade microbiana

Os métodos moleculares tem substituído os métodos convencionais no estudo da diversidade populacional microbiana, pois contribuem para a rápida identificação e quantificação dos microrganismos, muitos dos quais não são cultiváveis nos meios conhecidos (HASTIE et al., 2008). Aproximadamente 10 a 50% da microbiota gastrointestinal são cultiváveis, pois a maioria desses microrganismos possuem exigências diferenciadas quanto ao teor de oxigênio presente no meio, sendo muitos deles anaeróbios estritos, possuindo necessidades nutricionais específicas e sofrendo interações com outras espécies presentes no ambiente, entre muitos outros fatores (ZOETENDAL et al., 2004).

As técnicas mais frequentemente utilizadas incluem como alvo o gene 16S rRNA que é utilizado como marcador genotípico pois possui um alto grau de conservação, permitindo assim, a clara diferenciação entre *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (JANS et al., 2012).

Entre as técnicas, destaca-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em formato multiplex (KWON et al., 2004), seguida da análise de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (multiplex PCR-RFLP) (JANS et al., 2012).

Al Jassim et al. (2005), estudando a diversidade genética de bactérias produtoras de ácido láctico (excluindo *Streptococcus*) no trato gastrointestinal equino, concluíram que, após a análise RFLP com as enzimas de restrição *MboI*, *HhaI* e *HinfI* e posterior seqüenciamento, a maioria dos isolados estavam intimamente relacionados com espécies dentro do gênero *Lactobacillus*, incluindo *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus mucosae* e *Lactobacillus delbrueckii*.

Morita et al. (2009) detectaram, através da técnica de PCR-eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) e análise dos fragmentos de 340 pb dos genes de 16S rDNA, que *L. hayakitensis*, *L. equigenerosi* e *L. equi* são as espécies de *Lactobacillus* predominantes na microbiota intestinal de equinos puro sangue saudáveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da dieta com níveis crescentes de inclusão de Farelo de Glúten de milho 21 (Refinazil[®]) sobre as populações de *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. nas fezes de equinos.

3.2 Objetivos específicos

Estudar as concentrações e espécies alvo de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. nas fezes de equinos recebendo dietas contendo níveis crescentes do coproduto Farelo de Glúten de Milho 21.

Determinar o melhor nível de inclusão do coproduto FGM 21 para a homeostasia dos microrganismos estudados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Local e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Setor de Equideocultura, da Prefeitura do Campus de Pirassununga/SP da Universidade de São Paulo-USP, com a utilização de quatro equinos adultos, sem raça definida, com peso de 445 ± 20 kg e idade média de 2,8 anos, alojados em baias individuais e dispostos em delineamento quadrado latino 4 x 4.

Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas conforme as exigências especificadas pelo Nutrient Requirements Council of horses (NRC, 2007) para animais em manutenção, compostas por 50% da energia proveniente do volumoso (feno de Jiggs) e 50% da energia proveniente do concentrado (Tabelas 1 e 2). Foram oferecidos, em média, 6,8 kg de feno de Jiggs e 2,8 kg de concentrado, distribuídos em duas refeições diárias, sendo servindo o volumoso antes do concentrado.

Tabela 1: Composição percentual dos concentrados experimentais

Ingredientes	Nível de FGM 21 no concentrado (%)			
	0	10	20	30
Milho moído	41	40	37,31	35,01
Farelo de trigo	35	27,66	22,66	17,16
Farelo de soja	9,49	7,66	5,38	3,2
FGM 21	0	10	20	30
Melaço	10	10	10	10
Calcário	2	2	2	2
Sal comum	1,3	1,4	1,4	1,4
Fosfato bicálcico	0,81	0,88	0,85	0,84
Premix vitamínico-mineral*	0,4	0,4	0,4	0,4
Total	100	100	100	100

*Níveis de garantia: Monóxido de Manganês (11.400,00 mg); Aditivo Antioxidante (25,00 mg); Iodato de Cálcio (26,00 mg); Selenito de Sódio (48,00 mg); Vitamina B12 (2.500,00 mcg); Pantotenato de Cálcio (1.500,00 mg); Biotina (20,00 mg); Vitamina B6 (764,00 mg); Cloreto de Colina (12.858,00 mg); Vitamina E (10.000,00 UI/kg); Vitamina A (1500.000,00 UI/kg); Vitamina K3 (240,00 mg); Vitamina D3 (150.000,00 UI/kg); Sulfato de Ferro (21.780,00 mg); Óxido de Zinco (25.000,00 mg); Sulfato de Cobre (6.250,00 mg); Sulfato de Cobalto (25,00 mg); Ácido Fólico (505,00 mg); Niacina (2.512,00 mg); Vitamina B2 (1.250,00 mg).

Tabela 2: Composição química dos concentrados e das dietas experimentais

Composição química dos concentrados experimentais					
Nutriente (%)	Nível de inclusão de FGM 21 (%)				Volumoso
	0	10	20	30	Feno Jiggs
Matéria seca	88,06	88,68	89,04	89,42	89,52
Matéria orgânica	90,42	91,06	90,70	90,73	93,64
Matéria Mineral	9,58	8,94	9,30	9,27	6,36
Proteína Bruta	15,01	16,02	15,45	14,50	12,00
Extrato Etéreo	3,00	3,09	3,19	3,21	0,90
Extrato não nitrogenado	51,13	49,46	47,81	45,01	8,74
Fibra em detergente neutro	21,28	22,49	24,25	28,01	72,00
Fibra em detergente ácido	5,74	6,31	6,50	7,14	30,04
Hemicelulose	15,54	16,18	17,75	20,87	41,97
Celulose	4,47	4,78	5,35	5,97	25,88
Energia Bruta (kcal/kg)	3963,0	3987,0	3952,0	4034,0	4275,0
Amido	35,93	34,01	33,50	32,88	4,88
Composição química das dietas experimentais					
Matéria seca	88,79	89,10	89,28	89,47	
Matéria orgânica	92,03	92,35	92,17	92,19	
Matéria Mineral	7,97	7,65	7,83	7,82	
Proteína Bruta	13,51	14,01	13,73	13,25	
Extrato Etéreo	1,95	2,00	2,05	2,06	
Extrato não nitrogenado	29,94	29,10	28,28	26,88	
Fibra em detergente neutro	46,64	47,25	48,13	50,01	
Fibra em detergente ácido	17,89	18,18	18,27	18,59	
Hemicelulose	28,76	29,08	29,86	31,42	
Celulose	15,18	15,33	15,62	15,93	
Energia bruta (kcal/kg)	4119	4131	4113,5	4154,5	
Amido	20,41	19,45	19,43	20,10	

Amostras fecais

O experimento foi realizado durante 72 dias, dividido em períodos de 15 dias, com 10 dias de adaptação à dieta e 4 dias de coleta total de fezes. Ao final do protocolo foi gerada uma amostra composta de cada animal. Para a detecção e enumeração de *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., duzentos (200) grs de fezes foram coletadas da amostra composta. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e caixas de isopor e levadas imediatamente para análise no Laboratório de Higiene Zootécnica do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP

Mensuração do pH

Em experimento coexistente realizado por Correa et al. (2015), o pH das fezes foram mensurados. As amostras foram coletadas durante os quatro dias de coleta de fezes em sacos plásticos, e encaminhadas, imediatamente para o laboratório, onde foi mensurado o pH através de pHmetro de bancada, introduzindo o pHmetro diretamente nas fezes frescas, e utilizando as primeiras fezes do dia.

Contagens de *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. nas fezes

As concentrações de *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. foram determinadas pela técnica de espalhamento em superfície (*spread plate*), onde 10 g de cada amostra fecal foi homogeneizada em 100 mL de água de peptona tamponada estéril a 0,1% e 0,1 mL das alíquotas foram plaqueadas (em duplicata) em placas de Petri nas diluições seriais de 10^{-1} a 10^{-6} , em KF *Streptococcus* ágar (Merck®), contendo 1% de 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto (TCC) para *Streptococcus* spp., e em Agar *Lactobacillus* MRS (M641) (Himedia®) para *Lactobacillus* spp. Após a semeadura das placas, estas foram incubadas em estufa à 38° C, por 48 horas, em jarras de anaerobiose (BBL GasPak Systems, BD, EUA). Após a incubação, a concentração das bactérias (UFC/g) foi determinada nas diluições correspondentes ao crescimento de 25 a 250 colônias por placa.

Extração do DNA

Para a extração de DNA foi utilizada metodologia modificada a partir de Fang e Hedin (2003). Nas placas correspondentes às diluições utilizadas para contagem, foram selecionadas, ao acaso, 10 colônias por amostra que foram transferidas individualmente para microtubos com 1mL de caldo BHI, mantidos sob agitação *overnight*. Na sequência, os microtubos foram centrifugados a $14000 \times g$ por 10 min, a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante de cada microtubo foi removido e o sedimento ressuspensionado em 100 μ L de água ultrapura. Posteriormente, cada amostra foi incubada a 95°C, por 10 min, e depois centrifugada por 2 min a $20800 \times g$, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, quantificado e congelado a -20°C para ser utilizado como substrato para as reações de PCR.

As quantificações (ng/ μ L) foram realizadas em espectrofotômetro (DS-11, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280} . Como branco foi utilizado água MilliQ.

PCR Multiplex de *Lactobacillus* spp.

Para as reações de PCR para *Lactobacillus* spp. foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os primers utilizados foram os descritos por Kwon *et al.* (2004) (Tabela 3). Em cada reação, 12,5 μ L de GoTaq® Colorless Mastermix 2X foi misturado a 1,0 μ L de cada primer (IDL03R, IDL04F, IDL11F, IDL22R, IDL31F, IDL42R, IDL52F, IDL62R e IDL73), juntamente com 1,0 μ L da amostra e 2,5 μ L de água livre de nucleases. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases. O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) compreendeu: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e, em seguida, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 51°C por 40 segundos e 68°C por 30 segundos, sendo a extensão final dada a 68°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram, na sequência, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), num volume de 8 μ L de amostra adicionados de um volume de 2 μ L de Blue/Orange Loading Dye (Promega, EUA). Na sequência, o gel foi submetido a coloração em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA) e, posteriormente, observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação do padrão de migração eletroforética com o uso de um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, EUA).

Tabela 3. Primers utilizados nas reações multiplex PCR para *Lactobacillus* spp.

Bactéria	Primer	Sequência (5'-3')	Segmento-alvo*	Produto (pb)
<i>Lactobacillus</i>	IDL03R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA	1178-1198	-
<i>Lactobacillus</i>	IDL04F	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	1499-1522	-
Grupo <i>L. casei</i>	IDL11F	TGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG	472-495	727
<i>L. acidophilus</i>	IDL22R	AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC	2079-2104	606
<i>L. delbrueckii</i>	IDL31F	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	1015-1039	184
<i>L. gasseri</i>	IDL42R	ATTTCAAGTTGAGTCTCTCTCTC	1748-1770	272
<i>L. reuteri</i>	IDL52F	ACCTGATTGACGATGGATCACCAGT	94-118	1105
<i>L. plantarum</i>	IDL62R	CTAGTGGTAACAGTTGATTAAACTGC	1900-1926	428
<i>L. rhamnosus</i>	IDL73R	GCCAACAAGCTATGTGTTCGCTTGC	1922-1946	448

PCR-RFLP para *Streptococcus* spp.

Para as reações de PCR-RFLP para *Streptococcus* spp. foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os primers utilizados foram descritos por Jans *et al.* (2012) (Tabela 4). Três perfis de RFLP são distinguidos com o conjunto de primers, sendo Grupo 1: As espécies de *S. gallolyticus* e *S. alactolyticus*; Grupo 2: *S. bovis*, *S. infantarius* e *S. infantarius* subsp. *coli* (= *S. lutetiensis*) e Grupo 3 contendo apenas a espécie *S. equinus*. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift® MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) compreendeu desnaturação inicial a 95°C por 3 min, e, em seguida, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 62°C por 30 seg e 72°C por 60 seg, sendo a extensão final dada a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram, na sequência, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X) e submetidos à coloração e foto-documentados como descritos para *Lactobacillus* spp. Os produtos de PCR obtidos foram então purificados com o kit GFX DNA Purification® (GE Healthcare, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram digeridos a 37°C por 2 horas, num volume final de 11,5 µL, sendo as enzimas utilizadas numa concentração final de 2 e 3 UµL⁻¹

para *XbaI* e *MseI*, respectivamente. As digestões foram realizadas separadamente para *XbaI* e *MseI*, em alíquotas do produto de PCR purificado apresentando os padrões de bandas descritos por Jans et al. (2012) (tabela 5).

Os produtos de PCR após a reação de digestão foram na sequência, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), em seu volume total adicionado de 2 µL de Blue/Orange Loading Dye (Promega, EUA).

O gel de agarose foi submetido à coloração em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA) e, posteriormente, observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Tabela 4. Primers utilizados nas reações de multiplex PCR para amplificação parcial do gene 16S rRNA do complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC).

Nome	Orientação	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
16S-SBSEC-fw	Senso	ATAACAGCATTTAACCCATGTTAG	1100
16S-SBSEC-3-fw	Senso	CATAACAGTGTTTAACACATGTTAG	
16S-SBSEC-4-fw	Senso	GCATAATAGTGTTTAACACATGTTAG	
16S-SBSEC-5-fw	Senso	ATAACAGCTTTTGACACATGTTAG	
16S-inf-rev	Antissenso	CTTTAAGAGATTTGCTTGCCG	

Tabela 5. Padrões de banda após digestão pelas enzimas de restrição *XbaI* e *MseI*

Grupo/Espécie	Enzima de restrição	Tamanho do Fragmento (pb)
<i>S. equinus</i> ,	<i>XbaI</i>	278, 842
Grupo <i>S. gallolyticus</i>	<i>XbaI</i>	278, 842
<i>S. equinus</i>	<i>MseI</i>	16, 17, 46, 88, 136, 152, 253, 411
Grupo <i>S. gallolyticus</i>	<i>MseI</i>	¹ 17-28*, 88, 136, 196, 227, 411
² Grupo <i>S. bovis</i> / <i>S. infantarius</i>	<i>MseI</i>	16, 17, 46, 88, 136, 152, 253, 411

¹ Três bandas entre 17 e 28 pb

² A diferenciação para *S. bovis* é dada pela ausência de banda após a reação de digestão pela enzima *XbaI*.

Análise estatística

A análise estatística empregada para a enumeração dos grupos bacterianos estudados foi ANOVA a 5% de significância e para a análise da detecção ao nível de espécie foi realizado o teste χ^2 (qui-quadrado) nas proporções, utilizando-se o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) através do Software SAS[®] versão 9.3. Para a conversão do número de UFC em log foi utilizado o software Excel do pacote Office (Microsoft[®]).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dietas com níveis crescentes de inclusão de FGM 21 não causaram efeitos ($p>0,05$) sobre as concentrações das populações de *Lactobacillus* ($p = 0,9820$) e *Streptococcus* ($p = 0,3570$). Em experimento concomitante, Correa *et al.* (2015) também não observaram efeito das dietas ($p>0,05$) sobre a cor e consistência, concentração de ácidos graxos de cadeia curta (predominância de acetato) e características físico-químicas das fezes (pH-6,7), reforçando os resultados obtidos para a composição microbiana.

Quando se testa a inclusão de novo ingrediente na dieta, espera-se que este modifique o mínimo possível as condições metabólicas do animal, conforme observado na presente pesquisa e anteriormente também por Al Jassim e Andrews (2009), para os quais a homeostasia no trato gastrointestinal equino é muito sensível a mudanças dietéticas, sendo que as alterações nos ingredientes constituintes das dietas podem ocasionar mudanças nas populações bacterianas.

Corroborando os dados obtidos neste trabalho, Brokner *et al.* (2012) citam que as bactérias fermentadoras de fibras apresentam melhor desempenho em pH 6,7, mesmo valor observado em trabalho coexistente, sugerindo que o ambiente do trato gastrointestinal estava favorável a atuação deste grupo de bactérias em detrimento das BALs. Para Schwartzkopf-Genswein *et al.* (2003), o aumento da inclusão de concentrado na dieta fornece uma maior disponibilidade de carboidratos não fibrosos, como amido e açúcares, favorecendo a proliferação das bactérias amilolíticas, produzindo consequentemente quantidades excessivas de AGCCs pela fermentação desses carboidratos. Alternativamente, como sugerido por Lindberg e Karlsson. (2001) e salientando a importância dos resultados aqui obtidos, a substituição de cereais ricos em amido do concentrado por ingredientes alternativos ricos em fibras de fácil fermentação pode diminuir os riscos de problemas relacionados com a fermentação do amido no intestino grosso.

Analisando-se conjuntamente os resultados, sugere-se que a dieta proposta obteve êxito ao diminuir o aporte de amido para o IG e com isso as BALs não possuíram substrato para desenvolvimento significativo. Inferência similar à proposta por Hansen et al. (2015), ao avaliarem duas dietas a base de feno e feno acrescido de aveia inteira, quando verificaram que a dieta de feno foi associada com um maior nível de diversidade e estabilidade temporal da microbiota cecal quando comparado com a dieta de feno e aveia inteira e que a disponibilidade de nutrientes não só muda a composição mas também a ecologia da microbiota cecal.

Não foi observado efeito ($P>0,05$) dos níveis de inclusão de FGM 21 sobre a população de *Lactobacillus* e *Streptococcus* nas fezes (tabela 6), dados que concordam com De-Fombelle et al. (2003) que caracterizaram o perfil microbiano e bioquímico dos diferentes segmentos do trato gastrointestinal (TGI).

Tabela 6: População de *Lactobacillus* e *Streptococcus* expressos em Log_{10} UFC/g de fezes (peso húmido) de cavalos recebendo dietas com níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21.

Grupo de microrganismo	Nível de FGM 21 no concentrado (%)				*Média [±] . DP
	0	10	20	30	
<i>Lactobacillus</i>	8,04	8,08	8,04	8,11	8,07±0,03
<i>Streptococcus</i>	7,15	7,10	7,23	7,09	7,14±0,06

*Média ± desvio padrão

As espécies-alvo de *Lactobacillus* spp. estudadas no presente trabalho são consideradas probióticas e exercem efeitos benéficos no hospedeiro como imunoestimulantes, e no tratamento de doenças, entretanto seus mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos, embora sugere-se que estão diretamente relacionados à saúde do trato gastrointestinal (KWON et al., 2004; COPPOLA e TURNES, 2004).

Dentro das dietas oferecidas para os animais, foram detectadas quatro espécies alvo, sendo elas: *L. delbruekii*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. gasseri*, com predominância de *L. rhamnosus* (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das espécies de *Lactobacillus* spp. nas fezes de cavalos recebendo dietas contendo níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21 expressos em % de isolados identificados

Espécie	Nível de inclusão de Farelo de Glúten de Milho				p-Valor
	0%	10%	20%	30%	
<i>L. delbruekii</i>	20,00	25,00	15,00	5,00	0,0925
<i>L. rhamnosus</i>	60,00	50,00	55,00	62,50	0,6815
<i>L. acidophilus</i>	7,50	7,50	7,50	15,00	0,5753
<i>L. gasseri</i>	5,00	0,00	0,00	0,00	0,1080
<i>Negativo</i>	7,50	17,50	22,50	17,50	0,3220

A manutenção da concentração das bactérias estudadas é uma característica que pode ser ressaltada, uma vez que o desequilíbrio poderia ocasionar uma possível colonização por bactérias patogênicas. Nesse sentido, o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes (exclusão competitiva), impedindo a ação dos mesmos (CROSS, 2002), conforme observado por Harlow *et al.* (2013). Pesquisa semelhante foi realizada por Weese *et al.* (2004) que isolaram espécies de *Lactobacillus* a partir de cavalos das quais *Lactobacillus pentosus* (WE7) demonstrou inibir *Salmonella*, *C. difficile* e *C. perfringens in vitro*, sugerindo efeitos benéficos, reforçando os resultados obtidos.

As espécies-alvo de *Streptococcus* spp. estudados no presente trabalho fazem parte do complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC) e possuem características importantes a serem destacadas como a capacidade de fermentar amido pela espécie *Streptococcus bovis*, característica não existente na espécie *Streptococcus equinus* (AL JASSIM e ROWE, 1999). Este fato reforça o encontrado no presente estudo, pois a espécie *Streptococcus equinus* foi a predominante nas fezes dos animais recebendo dietas alta fibra, portanto a dieta não disponibilizou grandes quantidades de amido para ser fermentado no intestino grosso, sendo uma alternativa segura para esses animais. Não foi observado efeito de dieta ($p>0,05$) para os grupos *S. bovis*/*S. infantarius* e *S. gallolyticus*, entretanto houve diferença ($P<0,05$) na espécie *Streptococcus equinus* a qual apresentou maiores concentrações na dieta com 10% de inclusão FGM 21 enquanto que os menores valores foram encontrados na dieta com 0%. (Tabela 8)

Tabela 8. Distribuição das espécies de *Streptococcus* spp. nas fezes de cavalos recebendo dietas contendo níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21 expressos em % de isolados identificados

Espécie	Nível de inclusão de Farelo de Glúten de Milho				p-Valor
	0%	10%	20%	30%	
<i>Negativo</i>	82,50	67,50	75,00	70,00	0,4382
Grupo <i>S. bovis/S. infantarius</i>	7,50	0,00	5,00	5,00	0,4172
* <i>S. equinus</i>	7,50 ^b	32,50 ^a	20,00 ^{ab}	25,00 ^a	0,0477
Grupo <i>S. gallolyticus</i>	2,50	0,00	0,00	0,00	0,3887

*Letras minúsculas na mesma linha diferem-se entre si (p< 0,05).

Segundo Al Jassim e Rowe (1999), *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus* são as bactérias produtoras de ácido láctico predominantes no intestino grosso dos cavalos. Ambas são homofermentativas, produzindo apenas L-lactato (ROWE *et al.*, 1994). Dado semelhante foi reportado por Endo *et al.* (2007), avaliando a diversidade e composição do grupo *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* nas fezes de seis cavalos Puro Sangue Inglês saudáveis, ao detectarem que, em quase todas as amostras testadas, *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus* foram predominantes dentro do grupo *Streptococcus*, sendo os valores encontrados para o gênero de 8,50 Log₁₀ células/g de fezes, superior ao encontrado na presente investigação. No presente estudo, o gênero *Lactobacillus* apresentou maiores concentrações quando comparado ao complexo SBSEC (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus* nas fezes de cavalos recebendo dietas com níveis crescentes de Farelo de Glúten de Milho 21

Gênero	Nível de inclusão de Farelo de Glúten de Milho					p-Valor
	N*	0%	10%	20%	30%	
<i>Streptococcus</i>	42	17,50	32,50	25,00	30,00	0,4382
<i>Lactobacillus</i>	134	92,50	82,50	77,50	82,50	0,3220

*N= número de amostras positivas consideradas para a análise estatística

Vários estudos estão focados nas diferenças entre populações microbianas em situações de sobrecarga de carboidratos ou laminite induzida (GARNER *et al.*, 1978; AL JASSIM *et al.*, 2005; MILINOVICH *et al.*, 2008, 2010; MOREAU *et al.*, 2014); no entanto, são igualmente

necessárias investigações de como essas populações se comportam perante a outras mudanças dietéticas, como a inclusão de ingredientes alternativos no concentrado, uma vez que se busca cada vez mais a melhoria na produtividade dos animais associada à alimentação adequada que supra as exigências de cada categoria de forma segura.

6. CONCLUSÕES

Dietas com inclusão do coproduto FGM 21 (superfibra), até o nível de 30% no concentrado, não promovem alterações na população microbiana fecal dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus* em equinos, inferindo-se a manutenção da homeostase de BALs no trato intestinal.

O melhor nível de inclusão do coproduto foi 10 %, visto que este nível apresentou uma maior concentração da espécie *S. equinus* quando comparado a espécie *S. bovis* (fermentadora de amido), a qual se apresentou inexistente neste nível de inclusão.

7. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo sob o número de processo 14.1.563.74.4, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra a eficácia da inclusão do coproduto Farelo de Glúten de Milho 21 no concentrado para equinos como uma alternativa para diminuir o aporte de amido na dieta e manter os números de *Lactobacillus* e *Streptococcus* em concentrações que não prejudiquem a homeostase microbiana e a fermentação no intestino grosso. Entretanto, futuras pesquisas com outras populações microbianas, como as bactérias fibrinolíticas, poderão contribuir para a melhor compreensão da diversidade microbiana taxonômica e funcional do TGI de equinos.

9. REFERÊNCIAS

Al JASSIM, R.A.M.; ROWE, J.B. Better understanding of acidosis and its control. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia** v.12, p. 91–97, 1999.

Al JASSIM, R.A.M. et al. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters** v.248, p. 75–81, 2005.

Al JASSIM, R.A.M and ANDREWS, F. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. **Veterinary clinics of North America: Equine Pract**, v. 25, p.199-215, 2009.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição Animal**. Vol. 2. Nobel, 425p. 1983.

ARRUDA, A.M.V.; RIBEIRO, L.B.; PEREIRA, E.S. Avaliação de alimentos alternativos para cavalos adultos da raça crioulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**., v. 38, n. 1, p. 61-68, 2009.

BAUER, E. et al. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. **Current Issues Intestinal Microbiology** V. 7, p. 35-51, 2006.

BLASI, D. A. et al. Corn gluten feed, composition and feeding value for beef and dairy cattle. Kansas State University, **Agricultural Experimental Station and Cooperative Extension Service**, Bulletin, MF-2488. 14 p., 2001.

BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E. Importância nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.246-258, 2009.

BRANDI, R. A. et al. Citrus Pulp in Concentrates for Horses. **Food and Nutrition Sciences (Online)**, v. 5, p. 1272-1279, 2014.

BROKNER C., et al. Equine pre-caecal and total tract digestibility of individual carbohydrate fractions and their effect on caecal pH response. **Archives Animal Nutrition** v.66, p. 490–506, 2012.

CALLAWAY, T. R. et al. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. **Journal Animal Science**., V. 88 n.12, p.3977–3983, 2010.

CARICILLI, A. M. et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **PLoS Biology**., v. 9, p. 1–21, 2011.

COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n. 4, p. 1297-1303, jul-ago, 2004.

CORREA, G.F.; et al. Impacto on digestibility and blood and fecal parameters of replacing wheat brain with corn gluten meal in concentrate of adult horses. **Livestock Science** v.186, p. 41-45, 2015.

COSTA, M.C e WEESE, J.S. The equine intestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**., v. 13, p. 121-128, 2012 a .

COSTA, M.C. et al. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **PLoS ONE**, v. 7, 2012 b.

COSTA, M.C. et al. Characterization and compararison of the bacterial microbiota in diferente gastrointestinal tract compartments in horses. **The Veterinary Journal**. V. 205, p. 74-80, 2015.

COVERDALE, J.A.; et al. Soybean hulls as an alternative feed for horses. **Journal Animal Science** v.82, p. 1663-1668, 2004.

COVERDALE, J. A. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Can the microbiome of the horse be altered to improve digestion? **Journal Animal Science** v.94, p. 2275-2281, 2016.

CRAWFORD, C. et al. Dietary fructan carbohydrate increases amine production in the equine large intestine: Implications for pasture-associated laminitis. **Journal Animal Science** v.85, p. 2949–2958, 2007.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, V. 34, p. 245-253, 2002.

CUMMINGS, J.H and MACFARLANE, G.T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v.21, p.357-365, 1997.

DALY, K. et al. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition** v. 107, p. 989-995, 2012.

DE-FOMBELLE, A.; JULLIAND, V.; DROUGAL, C. Feeding and microbial disorders in horses: 1 – effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 21, p. 439-445, 2001.

DE-FOMBELLE, A.; et al. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. **Animal Science** v.77, p. 293-305, 2003.

DUREN, S. Feeding the endurance horse. **Kentucky Equine Research**. p. 351-363, 2000.

ENDO, A.; OKADA, S.; MORITA, H. Molecular profiling of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses. **Journal of General and Applied Microbiology** v. 53, p. 191-200, 2007.

FANG, H.; HEDIN, G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology** v.41, p. 2894–2899, 2003.

FRAPE, D. **Nutrição & alimentação de equinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 602 p., 2008.

FREITAS, A.C.; et al. Refinazil como ingrediente de Rações para frangos de corte. **Revista Científica de Produção Animal** v.8, p. 11-20, 2006.

FURTADO, C. E.; BRANDI, R. A.; RIBEIRO, L. B. Utilização de coprodutos e demais alimentos alternativos para dietas de equinos no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.214-223, 2011.

GARNER, H.E. et al. Equine laminitis of alimentary origin - experimental model. **American Journal of Veterinary Research**. v. 36, n.4, p. 441–444, 1975.

GARNER, H.E. et al. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. **Journal Animal Science** v. 45, p. 1037-1041, 1977.

GARNER, H.E. et al. Changes in the cecal flora associated with the onset of laminitis. **Equine veterinary Journal** V.10, p. 249-252, 1978.

GUPTA V.; GARG R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.27, p. 202-209, 2009.

HANSEN, N.C.K. et al. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial Ecology in Health & Disease** v. 26, 2015.

HARLOW, B.E.; LAWRENCE, L.M.; FLYTHE, M.D. Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: Responses to antibiotic challenge. **Veterinary Microbiology** v. 166, p. 225-232, 2013.

HARLOW, B.E. et al. Effect of starch source (corn, oats or wheat) and concentration on fermentation by equine faecal microbiota in vitro. **Journal of Applied Microbiology**. V. 119, p. 1234-1244, 2015.

HASTIE, P. M.; MITCHELL, K.; MURRAY, J. A. Semi-quantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. **British Journal of Nutrition.**, v.100, n.3, p.561–568, 2008.

HOFFMAN, R.M. et al. Hydrolyzable carbohydrate in pasture, hay, and horse feeds. Direct assay and seasonal variation. **Journal Animal Science**, v. 79, p. 500-506, 2001.

HOFFMAN, R. M. Carbohydrate metabolism in horses. In: **Recent Advances in Equine Nutrition**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2003.

HOFFMAN, RHONDA. M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V. 38, p. 270-276, 2009.

HONEYMAN, M.S.; ZIMMERMAN, D.R. Long-term effects of corn gluten feed on the reproductive performance and weight of gestating sows. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1329-1336, 1990.

JANS, C.; LACROIX, C.; MEILE, L. A novel multiplex PCR/RFLP assay for the identification of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members from dairy microbial communities based on the 16S rRNA gene. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 326, n. 2, p. 144–150, 2012.

JULLIAND, V. et al. E. Feeding and microbial disorders in horses: Part 3 – Effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.21, n.11, p.534-546, 2001.

JULLIAND, V., and P. GRIMM. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge1. **Journal of Animal Science** v. 94, p. 2262-2274, 2016.

KABE, A.M.G. **Palatabilidade, qualidade de fezes e digestibilidade aparente de equinos submetidos a dietas com diferentes níveis de inclusão de casca de soja**. 61 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia- Qualidade e produtividade animal). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

KABE, A.M.G.; et al. Soybean Hulls in Equine Feed Concentrates: Apparent Nutrient Digestibility, Physicochemical and Microbial Characteristics of Equine Feces. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 36, p. 77-82, 2016.

KAWAUCHI, I.M. **Farelo de Glúten de milho 21 na alimentação de cães adultos**. Dissertação de Mestrado- 83 P. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –Universidade Estadual Paulista-

Unesp–Jaboticabal, 2008. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/zoo/m/3484.pdf>
Acesso em 20 de junho de 2015

KILIAN, M. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Borrielo, S.P.; Murray, P.R. & Funke, G. (eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. **American Society for Microbiology Press**, 10 th edition, v. 2. Washington DC, EUA. p. 833-881, 2005.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n. 2, p. 103-125, 1998.

KREHBIEL, C. R.. et al. Feeding Wet Corn Gluten Feed to Reduce Subacute Acidosis in Cattle, **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p. 2931- 2939, 1995

KRONFELD, D. A practical method for ration evaluation and diet formulation: an introduction to sensitivity analysis. In: PAGAN, J.D. (Ed.) Advances in equine nutrition II. Versailles: **Kentucky Equine Research**, p.13-28, 2001.

KWON, H. S. et al. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers base don the región extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**. V. 239, p. 267-276, 2004.

LEWIS, L. **Nutrição Clínica Equina: Alimentação e Cuidados**. São Paulo: Roca, 710 p., 2000.

LINDBERG, J.E and KARLSSON, C.P. Effect of partial replacement of oats with sugar beet pulp and maize oil on nutrient utilization in horses. **Equine Veterinary Journal** v. 33, p. 585-590, 2001.

MACEDO, L.G.P. et al. Substituição de farelo de soja pela farinha de glúten de milho na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.32, n.4, p. 992-1001, 2003.

MACKIE, R.I.; WILKINS, C.A. Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. **Applied an Environmental Microbiology**, v.54, n. 9, p. 2155-2160, 1988.

MANZANO, A. et al. Polpa de citros peletizada na alimentação de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 29, n. 6, p. 1327-1332, 1999

MENEZES, M.L. et al. Effects of diets with increasing levels of citrus pulp on the blood parameters linked to energy metabolism in horses. **Ciência e Agrotecnologia.**, Lavras, v. 38, n. 6, p. 598-597, nov-dez., 2014.

MEYER, H. **Alimentação de cavalos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 303 p., 1995.

MILINOVICH, G.J. et al. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. **Environmental Microbiology** v.8, p. 885-898, 2006.

MILINOVICH, G.J. et al. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. **The ISME Journal** V.2, p. 1089-1100, 2008.

MILINOVICH, G.J. et al. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. **The Veterinary Clinical North America-Equine Practice** v. 26, p. 79-94, 2010.

MOREAU, M.M. et al. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. **Veterinary Microbiology.**, V. 168, p. 436-441, 2014.

MOREIRA, C. G. et al. Palatability and digestibility of horse diets containing increasing levels of citrus pulp. **MVZ Córdoba** V. 20, p. 4546-4557, 2015.

MORGADO, E.S. et al. Digestão dos carboidratos de alimentos volumosos em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia.**; v.38, n.1, p. 75-81, 2009.

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

MORITA, H. et al. Molecular monitoring of the main changes in bacterial floral diversity in the gastrointestinal tract of a Thoroughbred foal with catarrhal enteritis by using PCRDGGE. **Journal of Equine Veterinary Science.** V.27,p. 14–19, 2007.

MORITA, H. et al. *Lactobacillus hayakitensis*, *L. equigenerosi* and *L. equi*, predominant lactobacilli in the intestinal flora of health throughbreds. **Animal Science Journal.** V. 80, p. 339-346, 2009.

MOROTOMI, M. et al. *Lactobacillus equi* sp. Nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from feces of healthy horses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**, V. 52, p. 211-214, 2002.

MUHONEN, S. et al. Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay. **Journal Animal Science.** V. 87, p. 2291-2298, 2009.

NEIVA, J.N.M. et al. Farelo de glúten de milho em dietas para ovinos em confinamento. **Revista Ciência Agronômica** v. 36, p. 111-117, 2005.

NETO, M.A.T. et al. Farelo de glúten de milho (FGM) para suínos em crescimento e terminação (desempenho). **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 24, p. 108-116, 1995.

NRC. National Research Council of the National Academies. Nutrient Requirements of Horses. 6th edition. Washington DC. **The National Academies Press**, 341p, 2007.

OLIVEIRA, G.J.C. et al. Influência da adição de pectina e farelo de soja sobre a digestibilidade aparente de nutrientes em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.3, p. 1184-1192, 2002.

OTT, E.A.; FEASTER, J.P.; LIEBS, S. Acceptability and digestibility of dried citrus pulp by horses. **Journal of Animal Science** v. 49, p. 983-987, 1979.

PAGAN, J. D. Carbohydrates in equine nutrition. **Kentucky Equine Research, Inc.**, Versailles, USA, 1998.

PHILIPPEAU, C. et al. Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. **Animal in: International Journal of Animal Bioscience** v. 9, p. 1943-1948, 2015.

QUADROS, J.B.S. et al. Digestibilidade Aparente e Desenvolvimento de Equinos em Crescimento Submetidos a Dietas Compostas por Diferentes Níveis de Substituição do Feno de Tifton 85 pela Casca de Soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.564-574, 2004

RESPONDEK, F. et al. Effects of short-chain, fructo-oligosaccharides on the microbial and biochemical profile of different segments of the gastrointestinal tract in horses. **Pferdeheilkunde**, v.23, p. 146-150, 2007.

ROWE, J.B.; LEES, M.J.; PETHICK, D.W. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. **Journal Nutrition.** V.124, P.2742S–2744S, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Placas de Petri com meio de cultura KF exibindo colônias de *Streptococcus* spp.

Fonte: Própria autoria

APÊNDICE B: Placas de Petri com meio de cultura MRS exibindo colônias de *Lactobacillus* spp.

Fonte: Própria autoria

APÊNDICE C- Fotografia de gel de agarose a 1,5% ilustrando amplicons obtidos a partir de amplificação parcial do gene 16S rRNA de *Lactobacillus* spp.

Figura 1. Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir de técnica de *multiplex*PCR para detecção de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA de *Lactobacillus* spp. (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Amostras 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11 e 13: *L. rhamonosus*. Amostra 5: *L. delbruekii*. Amostras 8 e 12: *L. acidophilus*. Amostra 14: controle negativo.

APÊNDICE D- Fotografia de gel de agarose a 1,5% ilustrando amplicons obtidos a partir de amplificação parcial do gene 16S rRNA de *Lactobacillus* spp.

Figura 2. Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir de técnica de *multiplex*PCR para detecção de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA de *Lactobacillus* spp. (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Amostras 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 13: *L. rhamnosus*. Amostra 5: *L. gasseri*. Amostra 12: sem banda detectada. Amostra 14: controle negativo.

APÊNDICE E- Fotografia de gel de agarose a 1,5% ilustrando amplicons a partir de amplificação parcial do gene 16S rRNA de *Streptococcus* spp.

Figura 3. Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir de técnica de *multiplex*PCR para detecção de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA de *Streptococcus*. (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Amostras 4, 5, 7, 10, 11, 12, 15 e 17 amostras de *Streptococcus*, (20) Controle negativo.

APÊNDICE F- Fotografia de gel de agarose a 2,0 % ilustrando produtos da digestão pela enzima de restrição *XbaI* sobre fragmentos parciais do gene 16S rRNA de *Streptococcus* spp.

Figura 4. Fotografia de gel de agarose 2,0 % corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir de técnica de *multiplexPCR-RFLP* para detecção de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA de *Streptococcus* spp, digeridos pela enzima de restrição *XbaI*. (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Amostras de 2 a 11: padrão de bandas de *Streptococcus equinus* ou Grupo *Streptococcus gallolyticus*; amostra 12: controle negativo.

APÊNDICE G- Fotografia de gel de agarose a 2,0 % ilustrando produtos da digestão pela enzima de restrição *MseI* sobre fragmentos parciais do gene 16S rRNA de *Streptococcus* spp.

Figura 5. Fotografia de gel de agarose 2,0 % corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir de técnica de *multiplex*PCR-RFLP para detecção de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA de *Streptococcus* spp., digeridos pela enzima de restrição *MseI*. (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Amostra 2: Grupo *Streptococcus gallolyticus*; amostras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9: padrão de bandas de *Streptococcus equinus*. Amostra 10: controle negativo.