

LUCAS BEN FIUZA HENRÍQUEZ

**Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em
parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade,
microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos
saudáveis**

Pirassununga

2022

LUCAS BEN FIUZA HENRÍQUEZ

Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos saudáveis

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal (VNP)

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

Pirassununga
2022

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. 4172 FMVZ	<p>Henríquez, Lucas Ben Fiuza Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos saudáveis / Lucas Ben Fiuza Henríquez. – 2022. 112 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2022.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal. Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.</p> <p>1. Canino. 2. Cevada. 3. Maltagem. 4. Manutenção. 5. Nutrição. I. Título.</p>
-----------------	--



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos saudáveis", protocolada sob o CEUA nº 5499160221 (ID 008855), sob a responsabilidade de **Márcio Antônio Brunetto e equipe; Lucas Ben Fiuza Henriquez** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/05/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of the malt extract intake effects on parameters of digestibility, palatability, immunity, fecal microbiota, and fermentative products in healthy adult dogs.", utilizing 12 Dogs (males and females), protocol number CEUA 5499160221 (ID 008855), under the responsibility of **Márcio Antônio Brunetto and team; Lucas Ben Fiuza Henriquez** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/20/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2021** a **07/2021**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 2 anos**

N: **12**

Linhagem: **Beagle e Cocker Spaniel Inglês**

Peso: **11 a 19 kg**

Local do experimento: Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos - CEPEN-Per/USP

São Paulo, 03 de agosto de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FICHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Henríquez, Lucas Ben Fiuza

Título: **Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos saudáveis**

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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aparecida Fiuza Henríquez e David Alex Henríquez, que não mediram esforços para sempre me fornecer uma boa educação, por sempre me apoiarem nas minhas empreitadas de mudança de cidade e me encorajaram a ir atrás dos meus sonhos.

Ao meu irmão, Gabriel Levi Fiuza Henríquez, por sempre tentar me ajudar quando podia.

Aos meus filhos de quatro de patas, Bud, Teca (in memoriam) e Zezinho, por sempre me receberem com uma imensa alegria quando eu chegava em casa após um dia cansativo no laboratório ou de manejo com os animais do CEPEN Pet.

Aos meus filhos peludos de consideração do CEPEN pet, obrigado por sempre me ouvirem e me fazerem companhia nos momentos em que não estava muito bem.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram e torceram por mim ao longo dessa caminhada chamada “mestrado”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, não poderia deixar de agradecer a Deus, que sempre me aconselhou em momentos difíceis ao longo da minha vida.

Também não posso deixar de demonstrar minha gratidão aos meus pais, David Alex Henríquez e Aparecida Fiuza Henríquez, por estarem presentes na minha vida desde o momento do meu nascimento e por sempre trabalharem duro para me dar uma boa educação e uma excelente qualidade de vida, se estou concluindo mais essa fase parte do mérito também é de vocês.

Ao meu irmão, Gabriel Levi Fiuza Henríquez, obrigado pela companhia desde que você nasceu, sempre serei grato pela nossa irmandade e parceria.

Aos meus filhos de quatro patas, Bud, Teca (in memoriam) e Zezinho, por me ensinarem o que é o verdadeiro amor, obrigado por sempre me escutarem e se fazerem presentes em momentos difíceis, seja com uma lambida ou dormindo pertinho de mim.

À toda minha família, avós, avôs, tias, tios, primas e primos, muito obrigado por estarem torcendo pelas minhas empreitadas, mesmo com a distância, sinto o amor e carinho de cada um de vocês.

Ao meu orientador, Marcio Antonio Brunetto, que me concedeu a oportunidade de fazer parte da sua equipe de pós-graduandos e do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet), obrigado pela confiança e por todas as oportunidades concedidas ao longo desses 3 anos, seja para escrever um artigo ou para ministrar uma aula/palestra.

À minha segunda família, a República Kapim Kanela (Unesp, Botucatu), obrigado por toda irmandade durante e depois da graduação, agradeço muito a cada um dos ex e atuais moradores por sempre me receberem de braços abertos quando precisei, vocês sempre terão um lugar para ficar onde quer que eu esteja morando. Em especial, agradeço ao Sérgio Júnior, Gabriel Kurokawa e Pedro Negri, obrigado por serem esses irmãos mais novos incríveis e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos da graduação: Gabriel Araujo, Thainna Porto, Jennifer Pereira Thainnan Germano, Sara Andrade, Lairana Sardinha, Ricardo Sousa, Leandro Pessin, Thamires Sturion, por sempre me apoiarem e me ajudarem desde a época de graduação, obrigado pela amizade de todos. Em especial, agradeço à

Letícia Garbin por ser uma amiga incrível, sempre me ajudando com conselhos sobre a vida.

Ao meu amigo Gustavo Noé, obrigado por ser meu psicólogo nas horas vagas e sempre me aconselhar, sua amizade é muito importante para mim.

Ao meu professor da graduação José Roberto Sartori, por ter me indicado o professor Marcio e por toda ajuda durante e após a graduação.

À minha amiga Ana Stradiotti, por ter me aceitado no seu projeto de pós-doutorado como aluno de treinamento técnico e por ter aberto os meus olhos para o mundo da pesquisa, também agradeço por continuar me aconselhando e ajudando sempre que possível.

À República Vira-Lata (USP, Pirassununga), obrigado por terem me recebido tão bem no meu primeiro ano aqui em Pirassununga.

Ao meu grande amigo Rafael Zafalon, obrigado por ser essa pessoa excêntrica, pela sua amizade e por todos os ensinamentos ao longo do mestrado, parte do meu conhecimento devo a você, espero que você continue sendo essa pessoa maravilhosa.

À minha mãezinha do coração Mariana Rentas (Mel), obrigado por ter me adotado e cuidado de mim ao longo desses anos, você me ensinou muito e continua me ensinando a cada dia, não só sobre nutrição de cães e gatos, mas também sobre a vida. Agradeço também por todo cuidado e carinho com os meus filhos de quatro patas, eles e eu sempre seremos gratos. Também não poderia deixar de agradecer por toda ajuda no meu projeto de mestrado, sem você, ele não teria acontecido.

À minha amiga Mariana Perini, obrigado por ter me recebido tão bem no meu primeiro dia em Pirassununga e por ter me apresentado a estrutura do CEPEN Pet com muito carinho, agradeço também todos os ensinamentos sobre comportamento felino e por toda ajuda e cuidado com os meus filhos peludos.

À minha amiga Roberta Bueno, obrigado por ter respondido a mensagem e ter tirado todas as dúvidas sobre a pós-graduação na USP daquele menino com cara pintada de laranja e preto segurando um cachorro (Bud) no colo, sempre serei grato por isso e por todas as coisas que você me ensinou ao longo do tempo que passamos juntos.

À minha amiga Larissa Risolia, que me conquistou em poucos meses em que convivemos e conseguiu me ensinar muita coisa, além de sempre me fazer rir durante nossas conversas.

À minha amiga Andressa Amaral, que mesmo fazendo pós-graduação em São Paulo sempre se fez presente, obrigado por sempre me ajudar, seja com coisas da pós-graduação ou conselhos sobre a vida.

Ao meu amigo Vinícius Vasques, obrigado por ser essa pessoa incrível, que sempre consegue alegrar meu dia. Sempre serei grato pela sua amizade e ajuda ao longo dessa jornada que é ser uma pessoa LGBTQIA+ na sociedade atual (ninguém larga a mão de ninguém).

À minha amiga Bruna Ruberti, por ser uma pessoa maravilhosa e engraçada, que sempre me animou quando precisei, obrigado por todo carinho e atenção que você sempre demonstrou por mim.

À minha amiga Daniela Machado, por sempre me escutar e me ajudar quando precisava, obrigado por ser paciente e escutar todos os meus áudios e tirar todas as minhas dúvidas sobre as questões burocráticas da qualificação e da dissertação.

Ao meu amigo Pedro Marchi (Tigi), obrigado por ter me ajudado a achar um lugar para ficar no começo do mestrado e pela sua amizade ao longo desses últimos meses.

Ao meu amigo Fabio Dercy, por toda ajuda ao longo do mestrado e pelas conversas engraçadas no WhatsApp quando eu o tentava explicar como salvar uma figurinha.

À colega de pós-graduação Vivian Pedrinelli, obrigado por toda ajuda com o SuperCrac e pelos ensinamentos sobre formulação de dieta caseira.

Ao colega de pós-graduação Rodrigo Olivindo, obrigado pelas risadas ao longo desses anos e pela parceria nos projetos em que trabalhamos juntos.

À colega de pós-graduação Raquel Pedreira, agradeço a ajuda ao longo desses anos de pós e parceria ao longo de disciplinas que cursamos juntos.

Aos moradores da Kit 533, obrigado por sempre estarem dispostos a me ajudar e pela amizade ao longo desses quase dois anos que moramos juntos. Em especial agradeço à Camila Azzolin e Milena Bugoni, sempre serei grato por ter conhecido vocês duas, obrigado por todas as risadas e rolês que fomos juntos.

Ao Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet) e ao Grupo de Estudos em Nutrição Pet (GENP), duas instituições que tive a honra em fazer parte durante o mestrado, agradeço todas as oportunidades e aprendizado.

Aos cães e gatos do CEPEN Pet, em especial: Apolo, Black, Cacau, Rock, Uly, Malu, Dumbo, Helga, Kiara, Nala, Timão e Pumba, obrigado por terem participado do meu projeto e por se comportarem durante todas as coletas, eu sempre os levarei no meu coração.

Às práticas profissionalizantes: Carolina Oliveria, Sabrina Cunha e Cristina Tonon, agradeço a amizade e por todos os momentos que vocês me proporcionaram, a rotina se tornava mais leve quando vocês estavam presentes. Aos funcionários do CEPEN: Josane Ferraz, Cecília Marques, Estela Bueno, Diego Tadeu, Daniel, Carlos, Wellington, Paraná e Lucineia Mestieri, obrigado por sempre cuidarem do CEPEN e por toda ajuda e amizade ao longo desses anos.

Aos estagiários do CEPEN, em especial: Mônica Tiemi, Pedro Firmiano, Felipe Sesti, Gustavo Frazile, Larissa Santos, Julia Freitas, Camila Abreu, Luca Ice, Julia Freitas, Jhenifer Gisto, Gabriela Nic, Jéssica Roio, Letícia Maturcci, Evelyn Fernanda, Pedro Matias, Ana Laura, Nicole Roldan, Fábio Aurélio, Tais Hara, Eduardo Fanchini, Gabriel Vieira, Ezequiel André, Willian Honda, Lucas Franco, Ana Paula Garcia, Amanda Andrade, Mariana Dias, Mileena Sayuri, Ariel de Castro, Amanda de Macedo, Gabriel Magnani, Felipe Balisa, Leonardo Principe, Paula Dias, Erika Pereira, Mayane Costa, Fernanda Barbosa, Gabriela Finardi, Guilherme Carlomanho, Thaísa Ferri, Rafael Hatamura, Gisele Ceretta, Nicolas Carvalho, Manoel Ferreira, Kelly Duarte e Giulia Palasio, obrigado pela ajuda ao longo do meu projeto e por tornarem meus plantões e a rotina mais divertida, todos vocês fizeram a diferença ao longo desses anos.

Aos alunos de iniciação científica: Gustavo Lima, Victória Zavisch, Daniel Zappa, Fernanda Yamamoto, Isabela Benelli e Matheus Macegozza por toda ajuda ao longo desses anos, agradeço pelos momentos que passamos juntos e pela amizade de vocês.

À Premier Pet, obrigado pelo auxílio na manutenção do CEPET Pet, pela ajuda na extrusão dos alimentos experimentais utilizados no projeto e pelas oportunidades de ministrar palestras para diferentes grupos e universidades. Em

especial, agradeço a Cristiana Pontieri por ter formulado os alimentos experimentais deste projeto.

À Tamires Medeiros, obrigado por ser minha amiga e sempre me ajudar e se preocupar comigo, mesmo quando você estava longe.

Ao Bruno Duarte, obrigado pela sua amizade e por todas as risadas e momentos pelos quais passamos juntos.

À Liotécnica, por ter patrocinado todo o projeto, obrigado pela confiança e parceria.

À Fábrica de Ração da Unesp/Botucatu, em especial: Michel e Alessandro, obrigado por toda ajuda ao longo daquele dia cansativo em que extrusamos os alimentos experimentais e pela paciência em explicar os processos que foram realizados.

À professora Cristina Massoco, por toda ajuda com as análises de imunidade deste projeto e pela paciência em me explicar os resultados e sanar todas as minhas dúvidas.

Ao Daniel Polizel e Letícia Soares, pela ajuda com as análises de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada, agradeço também pela paciência em me ajudar a entender os resultados obtidos.

Aos funcionários do Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia: Renata Conti, Gilson Godoy e Ana Elci, por toda ajuda com as análises bromatológicas e de produtos de fermentação, também agradeço pelas risadas e bons momentos que passamos juntos, vocês tornavam a rotina de análises e do laboratório mais leve.

À Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (BPI, Botucatu), em especial ao funcionário Caio Munhoz, pela ajuda com a análise de microbiota fecal e pela paciência em explicar a técnica utilizada e os resultados.

Ao professor Júlio Balieiro, obrigado pela ajuda com a análise estatística dos dados de microbiota fecal e pela paciência em me explicar como discuti-los e apresentá-los.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ao Departamento de Nutrição e Produção Animal e ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal, agradeço pela oportunidade e pela forma que fui recebido, também sou grato a todos os funcionários que me ajudaram direta ou indiretamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida ao longo desses dois anos de mestrado, sem ela não seria possível que eu concluísse esta etapa.

Aos professores Ricardo Ventura, Paulo Mazza, Cintia Gonçalves (in memoriam) e Christianne Rodrigues, pelas disciplinas excepcionais que ministraram e que tive a oportunidade de participar.

Por fim, ao Lucas Dias Ribeiro, obrigado por ter sido um parceiro incrível ao longo do tempo que ficamos juntos, se estou aqui hoje é porque você esteve ao meu lado em parte dessa jornada, sempre me apoiando e me ajudando, mesmo durante as minhas crises de ansiedade e depois de ter conhecido parte dos meus defeitos. Espero que um dia eu possa retribuir um pouco do que você me deu.

Meus sinceros agradecimentos!

“Orgulho por ser quem somos, por lutar e resistir diariamente.”

Mayara Benatti

“Tente mover o mundo, o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

“Não é da minha natureza cair sem lutar, mesmo quando as coisas parecem insuperáveis.”

Katniss Everdeen

“O passado pode doer, mas, do jeito que eu vejo, você pode fugir dele ou aprender com ele.”

Rafiki

“Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela. Ponto final.”

Christopher Gardner

RESUMO

HENRÍQUEZ, L.B.F. **Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos saudáveis.** [Evaluation of the effects of malt extract ingestion on parameters of digestibility, palatability, immunity, fecal microbiota and fermentative products in healthy adult dogs]. 2022. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O coproduto extrato de malte, derivado de grãos de cevada, apresenta constituintes antioxidantes e prebióticos. Diante do exposto, o intuito do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de extrato de malte na dieta de cães saudáveis sob digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos. O delineamento experimental utilizado foi o *crossover* 2x2. Foram utilizados 12 cães saudáveis com dois anos de idade, distribuídos aleatoriamente em dois grupos de acordo com o alimento consumido: Alimento Controle (AC), sem a adição de extrato de malte, e Alimento Malte (AM), com a adição de 1,0% de extrato de malte (matéria natural), durante dois períodos experimentais. O consumo de alimento, escore fecal, digestibilidade aparente dos nutrientes, palatabilidade, produtos fermentativos, microbiota fecal e imunidade foram comparados após o consumo dos alimentos experimentais. Os resultados obtidos foram analisados pelo software computacional *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.4). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Não foram observadas diferenças nos parâmetros de digestibilidade aparente dos nutrientes, palatabilidade e produtos fermentativos. O filo predominante para os dois grupos foi o Firmicutes ($p < 0,0001$), sendo a média deste maior para o tratamento AM. Houve diferença para os grupos bacterianos pertencentes ao *cluster Clostridium XIVa* e gênero *Faecalibacterium* ($p < 0,0001$), que são bactérias responsáveis pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, sendo as médias destes grupos maiores para o tratamento AM, além disso, para este tratamento foi observada redução do gênero *Bifidobacterium* ($p < 0,0001$). Após o consumo do AM, também houve aumento do índice ($p = 0,0071$) e da taxa ($p = 0,0025$) de proliferação de linfócitos e na relação de linfócitos $CD4^+ : CD8^+$ ($p = 0,0098$). Concluiu-se que a inclusão de 1,0% de extrato de malte na dieta apresentou efeito prebiótico em cães adultos saudáveis.

Palavras-chave: canino, cevada, maltagem, manutenção, nutrição.

ABSTRACT

HENRÍQUEZ, L.B.F. **Evaluation of the effects of malt extract ingestion on parameters of digestibility, palatability, immunity, fecal microbiota and fermentative products in healthy adult dogs.** [Avaliação dos efeitos da ingestão de extrato de malte em parâmetros de digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota fecal e produtos fermentativos em cães adultos saudáveis]. 2022. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The co-product malt extract, derived from barley grains, has antioxidant and prebiotic constituents. Given the above, the aim of this study was to evaluate the effect of including malt extract in the diet of healthy dogs under digestibility, palatability, immunity, fecal microbiota, and fermentative products. The experimental design used was the 2x2 crossover. Twelve healthy two-year-old dogs were used, randomly divided into two groups according to the food consumed: Control Food (AC), without the addition of malt extract, and Malt Food (AM), with the addition of 1.0% malt extract (natural matter) during two experimental periods. Food consumption, fecal score, apparent nutrient digestibility, palatability, fermentative products, fecal microbiota, and immunity were compared after consumption of experimental foods. The results obtained were analyzed by the computer software Statistical Analysis System (SAS, version 9.4). Values of $p < 0.05$ were considered significant. No differences were observed in the parameters of apparent digestibility of nutrients, palatability, and fermentation products. The predominant phylum for both groups was Firmicutes ($p < 0.0001$), the mean of which was higher for the AM treatment. There was a difference for the bacterial groups belonging to the *cluster Clostridium XIVa* and genus *Faecalibacterium* ($p < 0.0001$), which are bacteria responsible to produce short-chain fatty acids, and the averages of these groups were higher for the AM treatment, in addition, for this treatment, reduction in the genus *Bifidobacterium* ($p < 0.0001$) was observed. After AM consumption, there was also an increase in the index ($p = 0.0071$) and rate ($p = 0.0025$) of lymphocyte proliferation and in the CD4+:CD8+ lymphocyte ratio ($p = 0.0098$). It was concluded that the inclusion of 1.0% of malt extract in the diet had a prebiotic effect in healthy adult dogs.

Keywords: canine, barley, malting, maintenance, nutrition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do extrato de malte.	48
Tabela 2 - Proporção de ingredientes dos alimentos experimentais.	49
Tabela 3 - Composição química dos alimentos experimentais.....	70
Tabela 4 - Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, produção fecal e concentração de ácido lático, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e pH fecais dos cães após o consumo dos alimentos experimentais.	71
Tabela 6 - Resultados dos testes de índice e taxa de proliferação de linfócitos e imunofenotipagem de linfócitos (porcentagem das células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e relação CD4 ⁺ :CD8 ⁺) em cães após o consumo dos alimentos experimentais.	75
Tabela 7 - Abundância relativa encontrada para filo nos grupos experimentais.	78
Tabela 8 - Abundância relativa encontrada para classe nos grupos experimentais.	79
Tabela 9 - Abundância relativa encontrada para família nos grupos experimentais.	81
Tabela 10 - Abundância relativa encontrada para gênero nos grupos experimentais.	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas do processo de malteação do grão de cevada.....	25
Figura 2 – Imagem de canil em que os cães foram alojados.	46
Figura 3 - Parque gramado onde os cães foram soltos.....	47
Figura 4 – Extrusora (Ferraz Máquinas E-100) da Fábrica de Ração da FMVZ/Unesp, campus de Botucatu, Botucatu – SP.....	48
Figura 5 - Cronograma dos períodos experimentais.	51
Figura 6 - Estufa de ventilação forçada 55°C (Marconi MA035/2).....	52
Figura 7 - A: Moinho de facas tipo Willey (Marconi MA340); B: Moinho de micro facas (Marconi MA048); C: Moinho analítico (Ika, A11 Basic Mill).	52
Figura 8 - Estufa 105°C (Fanem 315).....	53
Figura 9 - A: Bloco digestor de proteína; B: aparelho destilador de MICRO-KJEDAHN (Marconi MA036).....	54
Figura 10 - A: Processo de hidrólise ácida; B: Aparelho extrator tipo Soxhlet fracionado com seis provas (Marconi MA487/6/250).	55
Figura 11 - Forno tipo mufla (Marconi MA385/3).....	55
Figura 12 - A: <i>Bag</i> utilizado para colocar amostra; B e C: Digestor para fibra (Marconi MA444/CI).	56
Figura 13 - A: Preparo da solução para análise de cálcio; B: Fervura da solução de cálcio; C: Amostra antes (roxo) e após (azul) a titulação com EDTA.	57
Figura 14 - A: Preparo da amostra para análise de fósforo; B: Espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer).	57
Figura 15 - Escala de escore fecal utilizada no presente estudo.	58
Figura 16 - Centrífuga refrigerada (Sorvall Legend MACH 1.6 R).....	59
Figura 17 - Cromatógrafo gasoso (GC HP 7890A).....	60
Figura 18 - Processo de destilação de nitrogênio.	61
Figura 19 - A: Amostras após centrifugação; B: Centrífuga (Fanem 206-R); C: Espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer).	62
Figura 20 - pHmetro de bancada (STARTER 3100).....	63
Figura 21 - Centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804R).	65
Figura 22 - Citômetro de fluxo (Becton Dickinson FACSCalibur).	65
Figura 23 – Resultados em porcentagem do teste de primeira escolha.....	72

Figura 24 - Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AC.	73
Figura 25 - Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AM.	73
Figura 26 - A: Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AC; B: Relação dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de um cão após o consumo do AC.	74
Figura 27 - A: Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AM; B: Relação dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de um cão após o consumo do AM.	74
Figura 28 - Taxa média de proliferação dos linfócitos dos dois tratamentos experimentais.	75
Figura 29 – Índice de diversidade filogenética de Faith dos grupos experimentais.	76
Figura 30- Índice de uniformidade de Pielou dos grupos experimentais.	77
Figura 33 - Distribuição dos filos bacterianos entre os grupos experimentais. .	78
Figura 34 - Distribuição das classes bacterianas entre os grupos experimentais.	79
Figura 35- Distribuição das famílias bacterianas entre os grupos experimentais.	81
Figura 36 - Distribuição dos gêneros bacterianos entre os grupos experimentais.	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Artigos publicados que avaliaram o fornecimento de diferentes prebióticos como moduladores de produtos de fermentação e da microbiota fecal em cães.....	32
Quadro 2 - Artigos publicados que avaliaram a correlação do fornecimento de diferentes ingredientes e o sistema imune em cães adultos.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Alimento controle
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR	Ácidos graxos de cadeia ramificada
AM	Alimento malte
ASVs	Variantes de sequência de <i>amplicon</i>
Ca	Cálcio
CDA	Coeficiente de digestibilidade aparente
EB	Energia bruta
ECC	Escore de condição corporal
EEHA	Extrato etéreo em hidrólise ácida
ENN	Extrativos não-nitrogenados
FB	Fibra bruta
FHA	Fitohemaglutinina
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
NEM	Necessidade energética para manutenção
P	Fósforo
PB	Proteína bruta
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Peso corporal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. EXTRATO DE MALTE	24
2.2. EXTRATO DE MALTE E PALATABILIDADE	25
2.3. EXTRATO DE MALTE E B-GLUCANOS	27
2.4. B-GLUCANOS COMO MODULADORES DE MICROBIOTA E PRODUTOS FERMENTATIVOS	29
2.5. B-GLUCANOS E IMUNIDADE	38
3. HIPÓTESE.....	44
4. OBJETIVOS	44
4.1. OBJETIVO GERAL	44
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1. LOCAL	45
5.2. ANIMAIS E INSTALAÇÕES.....	45
5.3. ALIMENTAÇÃO	47
5.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	50
5.5. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E ESCORE FECAL	51
5.6. TESTES DE PALATABILIDADE	58
5.6.1. Aceitabilidade	58
5.6.2. Preferência	58
5.7. AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FERMENTATIVOS.....	59
5.7.1. Determinação das concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia ramificada.....	59
5.7.2. Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal fecal	61
5.7.3. Determinação do ácido láctico fecal.....	62
5.7.4. Determinação do pH fecal	63
5.8. AVALIAÇÃO DO SISTEMA IMUNE	63
5.8.1. Teste de proliferação de linfócitos	63
5.8.2. Imunofenotipagem de linfócitos	66
5.9. DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL	67
5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
6. RESULTADOS	70

6.1. ANIMAIS	70
6.2. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E VARIÁVEIS FECAIS	70
6.3. TESTES PALATABILIDADE	72
6.3.1. Aceitabilidade.....	72
6.3.2. Preferência.....	72
6.4. AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE	72
6.5. MICROBIOTA	75
6.5.1. Índices de diversidade	75
6.5.2. Taxonomia	77
7. DISCUSSÃO	85
8. CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente atribuição dos cães como membros da família, o bem-estar e saúde destes animais tornaram-se preocupações constantes para seus tutores, que querem prolongar e melhorar a qualidade de vida de seus pets (IBGE, 2015; IPB, 2018; ABINPET, 2019). Por consequência, o interesse e as exigências dos proprietários em relação à alimentação de seus animais têm crescido (BUCHANAN et al., 2011; DENG; SWANSON, 2015; ABOOD; VERTON-SHAW, 2021). Na atualidade, a nutrição objetiva não apenas suprir a necessidade alimentar dos animais, mas igualmente, auxiliar no bem-estar, melhorar a saúde e atenuar o risco de afecções (BUCHANAN et al., 2011; DI CERBO et al., 2017; GUPTA et al., 2021).

Aditivos são empregados na alimentação animal com a função de suprir exigências nutricionais, que as matérias primas que os compõe não fornecem. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), estes podem ser substâncias, microrganismos ou produtos formulados, que apresentem ou não valor nutritivo e, sua adição pode melhorar as características dos produtos destinados à alimentação ou também atender as necessidades nutricionais do animal.

O extrato de malte derivado de grãos de cevada, pode ser encontrado nas formas comerciais em pó e xarope. Este ingrediente pode ser utilizado como aditivo na fabricação de pães, biscoitos, macarrão, chás e bebidas maltadas para seres humanos (PAIK; LOW; INGLEDEW, 1991; MEINTS; HAYES, 2020). Ele pode apresentar em sua composição compostos que conferem capacidade antioxidante, características palatáveis e potencial prebiótico, que podem promover benefícios à saúde e melhorar o aroma e sabor de produtos alimentícios (ULLRICH et al., 1986; GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; ŠIMIĆ et al., 2017; BETTENHAUSEN et al., 2018).

Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliaram a aplicação do extrato de malte na alimentação de cães. Baseado neste aspecto e na demanda cada vez maior por coprodutos que apresentem características nutracêuticas, estudos que envolvam possíveis novos aditivos, como o extrato de malte, na nutrição de cães e outras espécies tornaram-se de interesse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EXTRATO DE MALTE

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2020), a produção de cevada mundial em 2019 foi em torno de 159 milhões de toneladas e a brasileira de 409 mil toneladas. A maior parte da produção brasileira de cevada é destinada à alimentação animal e à produção de malte (TONIAZZO et al., 2017; MARTÍNEZ et al., 2018). Porém, há crescente interesse por este grão, que pode atuar como alimento funcional, devido aos compostos bioativos presentes em sua composição, como β -glucanos e oligossacarídeos, que no organismo atuam como prebióticos; além de tocoferóis e compostos fenólicos, que possuem capacidade antioxidante (QURESHI et al., 1986; MAILLARD et al., 1996; JADHAV et al., 1998; OMWAMBA; HU, 2009; NEWTON et al., 2011; MARTÍNEZ et al., 2018; ŠIMIĆ et al., 2019; MEINTS; HAYES, 2020).

O malte produzido a partir dos grãos de cevada é obtido pelo processo de malteação ou maltagem e é muito utilizado na produção de cervejas (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; ARIF et al., 2011). Este processo envolve uma série de reações bioquímicas e fisiológicas, com a quebra da parede celular do endosperma e da ação de enzimas hidrolíticas (HENRY, 1988; GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010). A técnica consiste em umidificar os grãos (processo de maceração), para que iniciem a germinação, que será posteriormente interrompida pela queima, por secagem ou torra. Após a retirada das radículas, obtém-se o grão de cevada malteado ou grão de malte (Figura 1) (HUDSON, 1986; GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; BEGEA et al., 2017; ÖZCAN; ALJUHAIMI; USLU, 2018).

Existem diferentes matérias-primas que podem ser utilizadas para a fabricação do extrato de malte, como a cevada não processada, os grãos de malte verde, que não passaram por nenhum processo de secagem e os grãos de malte claro e escuro, que passaram, respectivamente, por processo de secagem a menos e mais de 100°C (YAHYA; LINFORTH; COOK, 2014; REICHEL et al., 2021).

O extrato de malte é obtido pela mosturação de grãos malteados, e é constituído pela parte solúvel extraída durante este processo (CELUS; BRIJS; DELCOUR, 2006), o que inclui aminoácidos e carboidratos, como glicose,

maltose, frutose, sacarose, maltotriose e maltotetraose (PAIK; LOW; INGLEDEW, 1991; COLLINS et al., 2003; DUKE; HENSON, 2008). Este ingrediente é utilizado na fabricação de alimentos de confeitaria e massas, como bolos e pizzas (BRIGGS, 1978). Além disso, pode ser utilizado em produtos alimentícios para melhorar o aroma e sabor. Suas características organolépticas variam de acordo com a variedade do grão e o processo de maltagem utilizado, torra seca ou úmida (ARIF et al., 2011). O extrato de malte pode apresentar diferentes composições e capacidade antioxidante de acordo com a variedade de cevada da qual foi extraído (GOUPY et al., 1999), essas variações também ocorrem devido ao processo de maltagem ao qual os grãos são submetidos (ZHAO; ZHAO, 2012).

Figura 1 – Etapas do processo de malteação do grão de cevada.



Fonte: adaptado de Carvalho et al. (2016).

2.2. EXTRATO DE MALTE E PALATABILIDADE

Há grande variedade de extratos de malte disponíveis no mercado, com diferentes finalidades, como para fabricação de cervejas, barras de cereais, chocolates, produtos de panificação, bebidas lácteas e sorvetes. Além disso, também podem apresentar diferentes sabores, como abiscoitado, caramelado, defumado e achocolatado (YAHYA; LINFORTH; COOK, 2014). O mosto do malte de cevada é um substrato com alta concentração de nutrientes, que na indústria de alimentos pode servir como adoçante, aromatizante e corante (BENDER, 2006; SKENDI; PAPAGEORGIU, 2018).

Não existem estudos na literatura que avaliaram o fornecimento de extrato de malte para cães, gatos ou outros animais. Porém, alguns estudos foram realizados com alimentos para seres humanos, como queijo branco (Dominati) e cerveja (JACKSON; HUDSON, 1978; ALY, 1997), com o intuito de avaliar se este ingrediente pode influenciar no sabor.

Em estudo realizado por Jackson e Hudson (1978) foram avaliadas cervejas com concentrações crescentes de extrato de malte (3, 10, 20 e 30%). Foi observada correlação positiva entre o aumento de índices de sabor e a quantidade de extrato de malte adicionada. Os autores concluíram que os componentes responsáveis por aumentar os índices foram os açúcares e os aminoácidos presentes na composição do extrato de malte.

A umidade e temperatura utilizadas nos processos de preparo de derivados dos grãos de cevada e malte, como o extrato, além da composição química dos grãos utilizados e período de germinação são fatores que podem modificar a cor e o sabor dos produtos aos quais os derivados são adicionados (YAHYA; LINFORTH; COOK, 2014; REICHEL et al., 2021). Os componentes que conferem diferentes sabores são gerados pelo escurecimento não enzimático dos grãos e pela reação de Maillard, que ocorre durante a oxidação lipídica dos ácidos graxos, ao longo do processo de preparo dos derivados (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Adicionar ingredientes com sabor adocicado, como xaropes ou frutas, pode melhorar a palatabilidade de alimentos para cães, pois já foi demonstrado que esses animais possuem receptores para sabores adocicados (FERRELL, 1984; DELANEY, 2006; JOHNSON; FREEMAN, 2017). Beal e Mottram (1993) avaliaram seis tipos de extrato de malte, que foram preparados com diferentes temperaturas (0, 40, 100, 114, 127 e 150°C) durante o processo de mosturação. As análises foram feitas com painel sensorial em 17 participantes. As características dos aromas variaram entre: “semelhante ao feno” e “semelhante às frutas” a “semelhante ao pão” e “semelhante ao chocolate”. Em estudo realizado por Reichel et al. (2021) foram analisados 4 tipos de extrato de malte com diferentes umidades, que exibiram compostos aromáticos distintos relacionados com sabores de pão, caramelo, amanteigado, torrado e queimado.

Além dos açúcares, sabe-se que as reações de Maillard que podem levar a formação de complexos, como carboidrato-proteína, também podem contribuir

para melhora da palatabilidade de alimentos para cães (DE BRITO et al., 2021). Na indústria *pet food*, essas reações ocorrem, em sua maioria, durante o processo de extrusão com a formação de compostos conhecidos como produtos da reação de Maillard (VAN ROOIJEN et al., 2013).

Parr et al. (2021) observaram que a temperatura e o tempo durante o processo de torra de grãos de cevada e malte resultaram na produção de diferentes compostos que modulam a palatabilidade. Grãos de malte verde apresentaram maiores concentrações de maltol e ácido acético, enquanto os grãos de malte torrado maiores concentrações de piridinas e 2-metil-furano. A formação destes diferentes compostos está relacionada com a umidade presente nos grãos e às reações de Maillard que ocorrem na presença de maior e menor concentração de água.

2.3. EXTRATO DE MALTE E B-GLUCANOS

A extração de β -glucanos pode ser realizada através da água, do uso de solventes, por extração enzimática ou por extração alcalina, independente do meio utilizado. O processo é trabalhoso e requer cuidado para que o produto final apresente qualidade (AHMAD et al., 2009, 2012). Portanto, o consumo de alimentos que contenham β -glucanos pode ser uma forma mais barata e fácil de ingerir este prebiótico.

Os β -glucanos são polímeros de β -D-glicose unidos por ligações glicosídicas. Estes constituem 75% da parede celular do endosperma do grão de cevada (FINCHER, 1975; BRIGGS, 1998; BAIK; ULLRICH, 2008; ŠIMIĆ et al., 2019) e são as fibras solúveis presentes em maior concentração na composição desse grão (JOHANSSON et al., 2008). Geralmente, os grãos de cevada contém entre 2 e 11% de β -glucanos em sua composição, de acordo com a variedade analisada (NEWMAN; NEWMAN, 2008). O endosperma também apresenta altas concentrações de proteína, amido e compostos fenólicos (ŠIMIĆ et al., 2019).

Durante o processo de maltagem, os β -glucanos são hidrolisados, o que libera o amido presente nos grãos (BRIGGS, 1998). Os β -glucanos liberados têm a capacidade de aumentar a viscosidade do mosto, devido a sua concentração e características físico-químicas, como o peso molecular (RIMSTEN et al., 2003; LAZARIDOU et al., 2004). Para a indústria cervejeira é desejável que o extrato de malte ou que os grãos de malte apresentem baixa concentração de β -

glucanos, pois estes podem aumentar a viscosidade das bebidas maltadas, para isto é necessária alta atividade da enzima β -glucanase durante o processo de maceração (BAMFORTH, 1985; LUSK et al., 2001; MEINTS; HAYES, 2020). Apesar de grande parte da produção de extrato de malte ser destinado a indústria cervejeira, os conhecimentos adquiridos sobre este aditivo permitem que empresas que o fabricam produzam extrato de malte com baixa concentração de β -glucanos para produção de cerveja e com maiores concentrações para outras finalidades.

Em estudo realizado por Teixeira et al. (2016) observou-se que a concentração de β -glucanos presente no grão de malte é menor, porém mais solúvel e com menor peso molecular, quando comparado com o grão de cevada. O peso molecular dos β -glucanos pode influenciar na sua biodisponibilidade (BIÖRKLUND et al., 2005), além disso, processos que envolvem alta ou baixa temperatura podem modificar as propriedades destes prebióticos (BEER et al., 1997). Durante o processo de extrusão de alimentos para cães e gatos, é preciso elevar a temperatura do extrusado, o que poderia degradar os β -glucanos presentes nos ingredientes, uma forma de contornar este problema seria adicionar ingredientes que contenham este prebiótico durante o processo de cobertura, que ocorre após a extrusão.

O processo de maceração e germinação, assim como a variedade de cevada utilizada, também podem influenciar na composição e nas características da fibra alimentar presente nos grãos de malte (TEIXEIRA et al., 2016). Adicionar ácido láctico e/ou aumentar a temperatura da água durante a maceração pode resultar em grãos de malte com maior concentração de fibra solúvel e β -glucanos, quando comparado com maltes preparados de forma convencional (TEIXEIRA et al., 2016). Ao aumentar a temperatura durante a maceração, a atividade da enzima β -glucanase é reduzida, o que ocasiona maior produção de β -glucanos durante a germinação (RIMSTEN et al., 2002, 2003). A concentração média de β -glucanos em grãos de malte pode variar de 0,1% a 1,4% da composição total em base de matéria seca, sendo esta similar ao encontrado no extrato de malte (MORGAN; GILL; SMITH, 1983; CHANDRA; PROUDLOVE; BAXTER, 1999; TEIXEIRA et al., 2016).

2.4. B-GLUCANOS COMO MODULADORES DE MICROBIOTA E PRODUTOS FERMENTATIVOS

Os β -glucanos são classificados como prebióticos que, dentro do intestino grosso, atuam como substrato para o crescimento e/ou atividade de determinados microrganismos que promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2017). O microbioma intestinal auxilia no desenvolvimento do sistema imune, função epitelial intestinal e saúde sistêmica do hospedeiro (SWANSON et al., 2002a).

Atualmente, uma das formas mais utilizadas para determinação da abundância de bactérias presentes na microbiota fecal e de outras amostras é através de tecnologias de sequenciamento de última geração (*next generation sequencing* – NGS), que permitem amplificar, sequenciar e identificar táxons presentes nas amostras (TURNBAUGH et al., 2007; KNIGHT et al., 2017). O princípio da técnica consiste na extração do DNA e na amplificação dos genes RNA ribossomal 16S (rRNA) por meio de *primers* bacterianos, o que permite a identificação de filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies bacterianas, conhecidas e desconhecidas, presentes na amostra (HANDL et al., 2011).

A maioria dos estudos que avaliou o fornecimento de β -glucanos para cães, utilizaram aqueles advindos de fungos e leveduras, que possuem ligações β -glicosídicas (1→3) e (1→6) diferentes daquelas presentes nos β -glucanos de cereais, como a cevada (1→4) e (1→3) (ŠIMIĆ et al., 2019). Além disso, fungos e leveduras podem apresentar maiores concentrações de β -glucanos em sua composição como, o extrato de parede celular de levedura, que apresenta concentração média de 25% (THEODORO et al., 2019). Diante disso, observa-se que talvez seja necessária maior inclusão de extrato de malte e outros coprodutos derivados de cereais na dieta, para obter resultados similares aos encontrados para outros aditivos que contenham β -glucanos.

Diversos estudos já demonstraram que a composição do alimento, idade, fatores genéticos e o status de saúde podem modular e influenciar na composição do microbioma gastrointestinal (HANDL et al., 2013; DENG; SWANSON, 2015), que é composto por uma população microbiana complexa, que apresenta microrganismos benéficos, como os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (REDFERN; SUCHODOLSKI; JERGENS, 2017), que são produtores de ácido lático e podem modular de forma indireta o sistema

imunológico dos animais (RENTAS et al., 2020). Além disso, os prebióticos podem auxiliar na redução da população de patógenos oportunistas presentes no intestino grosso, como algumas espécies pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Escherichia*, que quando estão presentes em grande quantidade podem resultar em malefícios à higidez dos animais (STRICKLING et al., 2000; MIDDELBOS et al., 2007).

Dentre as funções do microbioma do intestino pode-se citar a defesa contra patógenos intestinais invasores e fornecimento de nutrientes para o hospedeiro via fermentação e atividade metabólica (SUCHODOLSKI et al., 2012). Além disso, a sua composição pode afetar tanto a absorção e metabolismo dos nutrientes quanto as funções tróficas e protetoras do hospedeiro. Alterações no equilíbrio do microbioma podem ocasionar o desenvolvimento de diversas desordens e doenças, como diarreia e doença inflamatória intestinal (SUCHODOLSKI et al., 2012; BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016). Além disso, em alguns estudos sugeriu-se que alterações no microbioma podem resultar em alergias, alterações na saúde bucal, ganho ou perda de peso, diabetes e alterações renais (WERNIMONT et al., 2020; MACEDO et al., 2022).

O microbioma intestinal de cães e gatos parece ser similar em alguns aspectos ao de seres humanos e ratos, essas quatro espécies apresentam predominância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, porém, existem algumas diferenças, como abundância superior a 10% do filo Fusobacteria no microbioma intestinal de cães e gatos (DENG; SWANSON, 2015).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), acético, propiônico e butírico, são os principais produtos da fermentação realizada pelas bactérias do intestino grosso, eles são produzidos pela fermentação de carboidratos e do ácido láctico (NOGUEIRA et al., 2019). Estudos em cães demonstraram que os β -glucanos são capazes de modular a população microbiana presente no trato gastrointestinal e, por consequência, a produção de AGCC (SWANSON et al., 2002b; RENTAS et al., 2020). A produção destes ácidos graxos pode promover resultados benéficos ao hospedeiro como, redução do pH luminal, o que pode criar condições desfavoráveis para a proliferação de bactérias patogênicas (COOK; SELLIN, 1998; SWANSON et al., 2002a; NOGUEIRA et al., 2019).

Além das fibras, as bactérias também fermentam parte da proteína que não é absorvida no intestino delgado e chega até o intestino grosso. A

fermentação desses componentes leva a produção de amônia e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) (valérico, isovalérico e isobutírico) que são considerados compostos putrefativos (MINER; HAZEN., 1969; NERY et al., 2012), que dependendo da sua concentração podem gerar odor desagradável nas fezes. Portanto, ao se avaliar a suplementação de um prebiótico ou de um ingrediente proteico é importante verificar se não há aumento na produção destes compostos.

Não foram encontrados estudos na literatura que avaliaram a suplementação ou a inclusão de extrato de malte no alimento como moduladores de produtos de fermentação e microbiota fecal em cães ou em outras espécies.

No Quadro 1 estão listadas as principais publicações que avaliaram o fornecimento de diferentes prebióticos para cães e observaram o efeito destes como moduladores de produtos de fermentação e da microbiota fecal.

Quadro 1 - Artigos publicados que avaliaram o fornecimento de diferentes prebióticos como moduladores de produtos de fermentação e da microbiota fecal em cães.

Autor/Ano	Título	Prebiótico utilizado	Objetivos	Principais resultados
SWANSON et al. (2002b)	Fructooligosaccharides and <i>Lactobacillus acidophilus</i> Modify Gut Microbial Populations, Total Tract Nutrient Digestibilities and Fecal Protein Catabolite Concentrations in Healthy Adult Dogs	Fructooligossacarídeos	Determinar se fructooligossacarídeos e /ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> afetam as populações microbianas intestinais, produtos fermentativos e a digestibilidade de nutrientes em cães adultos saudáveis	Após a ingestão de alimentos que continham fructooligossacarídeos, foi observada redução na população de bactérias do gênero <i>Clostridium</i> e aumento de bactérias dos gêneros <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> . Além disso, foi observado aumento na concentração de lactato e de ácido butírico e redução da amônia fecal e dos ácidos isobutírico e isovalérico nas fezes
SWANSON et al. (2002c)	Effects of Supplemental Fructooligosaccharides Plus Mannanoligosaccharides	Fructooligossacarídeos e mananoligossacarídeos	Verificar se a suplementação de fructooligossacarídeos e mananoligossacarídeos	A suplementação dos dois prebióticos aumentou a população de bactérias dos gêneros <i>Bifidobacterium</i> e

	on Immune Function and Ileal and Fecal Microbial Populations in Adult Dogs		influenciam na imunidade e nas populações microbianas ileais e fecais de cães adultos	<i>Lactobacillus</i> . Além disso, a suplementação também alterou a imunidade
FLICKINGER et al. (2003)	Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets	Frutano (frutooligossacarídeos e oligofrutose)	Avaliar os efeitos de diferentes concentrações dietéticas de frutooligossacarídeos e oligofrutose na digestibilidade dos nutrientes, microbiota fecal e produtos de fermentação fecal e proteína urinária em cães adultos saudáveis	A suplementação de oligofrutose reduziu a digestibilidade aparente de alguns nutrientes. Enquanto a suplementação de frutooligossacarídeos reduziu a concentração de bactérias do gênero <i>Clostridium</i> .
BELOSHAPKA; WOLFF; SWANSON (2012)	Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end	Polidextrose	Determinar os efeitos da polidextrose em diferentes concentrações nas características fecais, microbiota e produtos	Foi observada correlação positiva entre a concentração dos ácidos acético e propiônico e ácidos graxos de cadeia curta totais com o aumento da dose de polidextrose. A população de

	products in healthy adult dogs		fermentativos em cães adultos saudáveis	bactérias do gênero <i>Clostridium</i> reduziu com o aumento da concentração da polidextrose
PANASEVICH et al. (2015)	Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet	Fibra de batata	Avaliar o efeito do aumento da inclusão de fibra de batata na microbiota fecal de cães adultos saudáveis	Foi observado aumento na concentração de bactérias do filo Firmicutes e do gênero <i>Faecalibacterium</i> e redução na população de bactérias do filo Fusobacteria após a ingestão dos alimentos que continham fibra de batata
LIN et al. (2019)	Effects of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (parede celular de levedura)	Avaliar os efeitos da parede celular de levedura nas características fecais, digestibilidade aparente dos macronutrientes, produtos de fermentação fecal, microbiota fecal, respostas imunológicas e	Foi observada maior concentração de bactérias do gênero <i>Bifidobacterium</i> e menor de bactérias do gênero <i>Fusobacterium</i> na microbiota fecal dos cães suplementados com o prebiótico

	function, and diet palatability in adult dogs		palatabilidade em cães adultos saudáveis	
NOGUEIRA et al. (2019)	Dietary supplementation of a fiber-prebiotic and saccharin-eugenol blend in extruded diets fed to dogs	Blend de prebióticos, sacarina e eugenol e blend de prebióticos mais sacarina e eugenol	Avaliar os efeitos da suplementação dietética de um blend de prebióticos isoladamente ou em combinação com um aditivo alimentar contendo sacarina e eugenol como potenciais promotores da saúde intestinal em cães adultos saudáveis	Foi observado aumento na produção de ácido propiônico e acético e redução de ácido isovalérico e isobutírico nas fezes dos animais após a ingestão dos prebióticos
THEODORO et al. (2019)	Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs	Parede celular de levedura e parede celular de levedura com mananoligossacarídeos	Avaliar os efeitos da inclusão de duas preparações de parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em alimentos extrusados, na digestibilidade de	A adição da parede celular de levedura com mananoligossacarídeos reduziu o coeficiente de digestibilidade aparente da gordura e aumentou a concentração fecal de ácido butírico e putrescina,

			nutrientes, produtos de fermentação e parâmetros imunológicos de cães adultos	além de reduzir a concentração de ácido lático nas fezes
RENTAS et al. (2020)	Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs	Galactooligossacarídeo e blend de prebióticos (continha β -glucano na composição)	Avaliar os efeitos de um prebiótico e de um blend de prebióticos, em diferentes concentrações, na digestibilidade dos nutrientes, produtos fermentativos e variáveis imunológicas em cães adultos	Foi observada tendência para redução da concentração do ácido isovalérico nas fezes dos animais que consumiram o alimento que continha galactooligossacarídeo
Santos et al. (2022)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> dehydrated culture modulates fecal microbiota and improves innate immunity of adult dogs	Cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> desidratada	Avaliar os efeitos da ingestão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sob digestibilidade, microbiota fecal, produtos fermentativos fecais e	Foi observado aumento da concentração de ácido propiônico fecal para os grupos que receberam o prebiótico. Para estes grupos, também foi observado aumento da abundância relativa dos filos

			imunidade em cães adultos saudáveis	Firmicutes e Actinobacteria e redução do filo Fusobacteria, além de maiores médias para os gêneros <i>Clostridium</i> e <i>Collinsella</i> e redução para <i>Allobaculum</i> e <i>Fusobacterium</i> .
--	--	--	-------------------------------------	---

2.5. B-GLUCANOS E IMUNIDADE

O sistema imunológico é responsável por proteger o organismo contra a invasão de patógenos, como bactérias e vírus. Ele pode ser dividido em dois tipos: inato e adaptativo. As barreiras epiteliais, como o revestimento do trato gastrointestinal são a primeira linha de defesa do sistema imune inato, que apresenta resposta rápida, porém inespecífica. O funcionamento deste sistema depende do reconhecimento da estrutura do patógeno invasor. Os leucócitos estão envolvidos na resposta adaptativa inicial, uma de suas funções é apresentar os antígenos aos linfócitos. A resposta imune adaptativa ocorre, basicamente, em duas etapas: primeiro ocorre a produção de anticorpos pelos linfócitos B (resposta imune humoral) e depois, caso seja necessário, os linfócitos T são estimulados e atacam as células corporais infectadas (resposta imune mediada por células) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Os β -glucanos possuem a capacidade de estimular o sistema imune (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009). A solubilidade, massa molecular, estrutura e método de extração podem influenciar na capacidade imunomoduladora dessas fibras (KULICKE; LETTAU; THIELKING, 1997; DAOU; ZHANG, 2012). Na literatura são exíguos os estudos que avaliaram a suplementação dos β -glucanos como agentes imunomoduladores em cães (STUYVEN et al., 2010). Geralmente, os β -glucanos destes estudos são utilizados como agonistas prototípicos (MITROULIS et al., 2018), que atuam após a vacinação, ligando-se a receptores de reconhecimento padrão, como a dectina-1, sendo considerados como padrões moleculares associados aos patógenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019), o que aumenta a resposta imune, através da maior produção de macrófagos (PARIS et al., 2020a). Além disso, a dectina-1 também é expressa em neutrófilos, eosinófilos, monócitos e algumas células T (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Nestes casos, a administração de β -glucanos pode ser realizada com a vacinação ou após, pois em ambas as situações, já foi demonstrado aumento da imunogenicidade em cães (PARIS et al., 2020b).

Quando os β -glucanos são administrados por via oral, eles podem perder o seu efeito imunoestimulador, por conta do pH ácido presente no estômago (KUDRENKO; SNAPE; BARNES, 2009; ULMIUS et al., 2012). Em estudos *in vitro* já foi demonstrado que os β -glucanos apresentam perda de peso molecular

durante o processo de digestão (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007). Por outro lado, pesquisadores que avaliaram a suplementação de fontes de β -glucanos em cães adultos saudáveis observaram melhor resposta do sistema imunológico nos animais suplementados (LIN et al., 2019; RENTAS et al., 2020). O fornecimento de β -glucanos dietéticos podem estimular macrófagos, neutrófilos e linfócitos, o que promove a resistência a bactérias patogênicas gram-negativas (WILLIAMS; MUELLER; BROWDER, 1996).

Os linfócitos podem ser divididos em alguns grupos, como as células T, B e os *natural killer* (MORTLOCK; WEI; WILLIAMSON, 2015). As células T podem desempenhar diferentes funções na resposta imune, por exemplo, as células T CD4⁺ ou T *helper* auxiliam na resposta imune desempenhada por outras células T e por células B, além de produzirem citocinas pró e anti-inflamatórias, já as células T CD8⁺ desempenham o papel de indução a apoptose de células infectadas por patógenos invasores, sendo conhecidas como T citotóxicas (ZENEWICZ; ANTOV; FLAVELL, 2009). A partir da quantificação da população relativa (%) destes grupos celulares, é possível determinar o índice chamado relação CD4⁺:CD8⁺, que é considerado um marcador de ativação do sistema imune, pois a população das células T CD8⁺ aumenta quando há invasão de patógenos no organismo, o que ocasiona redução do índice e, após o controle da invasão, normalmente, reduz e o índice volta à normalidade (BRUNO et al., 2017).

Para que as células T desempenhem seu papel, a proliferação é um fator importante, pois ela permite a diferenciação e homeostase destes grupos celulares (MORTLOCK; WEI; WILLIAMSON, 2015). A análise de proliferação linfocitária pode ser realizada com diferentes mitógenos, como a concavalina-A e a fitohemaglutinina (FHA), a partir dela é obtido o índice de proliferação que é uma relação entre células tratadas e não tratadas com mitógeno, o que permite simular e avaliar a eficácia do sistema imune em reagir à invasão de patógenos (TIZARD, 2009).

No Quadro 2 estão listados os principais estudos em cães que avaliaram a relação do fornecimento de β -glucanos advindos de diversas fontes e imunidade.

Quadro 2 - Artigos publicados que avaliaram a correlação do fornecimento de diferentes ingredientes e o sistema imune em cães adultos.

Autor/Ano	Título	Ingrediente	Objetivos	Principais resultados
PAWAR et al. (2017)	Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs	Mananoligossacarídeos (fonte de β -glucanos)	Avaliar os efeitos da suplementação dietética de mananoligossacarídeos na digestibilidade dos nutrientes, fermentação intestinal, resposta imune e índices antioxidantes em cães	A resposta imune inata foi maior nos cães que receberam a suplementação. A porcentagem de subpopulações de linfócitos CD4 ⁺ e a proporção de CD4 ⁺ :CD8 ⁺ também foram maiores no grupo suplementado. Além disso, a suplementação do prebiótico reduziu as concentrações séricas de colesterol total e LDL
FERREIRA et al. (2018)	Oat beta-glucan as a dietary supplement for dogs	Aveia (fonte de β -glucanos)	Avaliar os efeitos da suplementação de β -glucanos de aveia nas variáveis metabólicas, fisiológicas, imunológicas	Os animais que consumiram alimento suplementado apresentaram menores concentrações séricas de colesterol total e lipoproteínas de baixa e muito baixa

			e nutricionais em cães adultos	densidade. Além disso, após a vacinação os animais suplementados apresentaram menor concentração sérica de IL-4
LIN et al. (2019)	Effects of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fonte de β -glucanos)	Avaliar os efeitos da parede celular de levedura nas características fecais, digestibilidade aparente dos macronutrientes, produtos de fermentação fecal, microbiota fecal, respostas imunológicas e palatabilidade em cães adultos saudáveis	As células auxiliares secretoras de IFN- γ e as células T citotóxicas aumentaram linearmente com o consumo do prebiótico. Além disso, as células imunes dos cães suplementados produziram menos TNF- α . Também foi observado aumento linear na IgE sérica com o aumento da dosagem do prebiótico
THEODORO et al. (2019)	Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their	Parede celular de levedura e parede	Avaliar os efeitos da inclusão de duas preparações de parede	Foi observada redução da produção de IL-6 nos animais após a ingestão da parede

	potential prebiotic properties in dogs	celular de levedura com mananoligossacarídeos	celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em alimentos extrusados, diferindo na solubilidade em água de mananoligossacarídeos, na digestibilidade dos nutrientes, produtos de fermentação e parâmetros imunológicos de cães adultos	celular de levedura com mananoligossacarídeos. Os animais que ingeriram apenas a parede celular de levedura apresentaram maior índice de fagocitose de monócitos
RENTAS et al. (2020)	Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs	Galactooligossacarídeo e blend de prebióticos (continha β -glucano na composição)	Avaliar os efeitos de dois prebióticos em diferentes concentrações na digestibilidade dos nutrientes, produtos fermentativos e variáveis imunológicas em cães adultos	Um dos tratamentos que possuía β -glucano em sua composição aumentou a concentração de células polimorfonucleares, além de aumentar a reação de burst oxidativo dos fagócitos e aumentar o processo de fagocitose das bactérias

				<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>
Santos et al. (2022)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> dehydrated culture modulates fecal microbiota and improves innate immunity of adult dogs	Cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> desidratada	Avaliar os efeitos da ingestão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sob digestibilidade, microbiota fecal, produtos fermentativos fecais e imunidade em cães adultos saudáveis	Não foram observadas diferenças para a maioria das variáveis imunes analisadas, como população relativa de linfócitos T CD4+, T CD8+ e relação CD4+:CD8+, porém, foi observada diferença para índice de fagocitose, para esta variável os grupos que receberam o prebiótico apresentaram maiores médias

3. HIPÓTESE

A inclusão de extrato de malte no alimento melhora a palatabilidade e modula a microbiota e imunidade de cães adultos saudáveis, sem interferir no aproveitamento de nutrientes.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da adição de 1,0% de extrato de malte (Dry Standard, Liotécnia Tecnologia em Alimentos S.A., São Paulo, Brasil), derivado de grãos integrais de cevada e cevada maltada, na matéria natural de alimento seco extrusado sob digestibilidade, palatabilidade, imunidade, microbiota e produtos fermentativos fecais de cães adultos saudáveis.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o extrato de malte pode atuar como palatilizante para cães;
- Avaliar se há modulação na microbiota fecal de cães após o consumo do alimento enriquecido com extrato de malte e se esta alteração melhora as respostas linfocitárias dos animais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob número de protocolo: 5499160221.

5.1. LOCAL

O estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), localizado no Campus Fernando Costa, em Pirassununga-SP.

5.2. ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Foram utilizados 12 cães (6 beagles e 6 cocker spaniel inglês) com peso corporal (PC) médio de $13,45 \pm 1,76$ kg, machos e fêmeas, hípidos, castrados, e adultos, com idade média de 2,0 anos. Todos os cães apresentaram escore de condição corporal (ECC) ideal ($5,25 \pm 0,44$) segundo a escala de 9 pontos validada por Laflamme (1997) e escore de massa muscular ideal (3) segundo a escala de 4 pontos validada por Michel et al. (2011).

Os animais tiveram sua higidez avaliada previamente por meio de exame físico, hemograma e bioquímicos (ureia, creatinina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, colesterol total, triglicérides e glicose). Para as análises da bioquímica sanguínea, as amostras de sangue foram coletadas após 12 horas em jejum e armazenadas em tubos BD Vacutainer® com ativador de coágulo BD Vacutainer®. A mensuração da concentração sérica das análises bioquímicas foi realizada com o auxílio de espectrofotômetro automático BS120 (Mindray China), utilizando-se kits comerciais Labtest. Para a realização dos hemogramas, foram utilizados tubos BD Vacutainer® com EDTA. Os resultados foram determinados com o auxílio do equipamento hematológico automático BC2800Vet (Mindray, China) e método May-Grunwald-Giemsa modificado, com exceção da proteína total plasmática que foi obtida por refratometria (Refratômetro portátil - Quimis, Brasil). Estas análises foram realizadas no Laboratório Clínico da Unidade Didático Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), localizado no Campus

Fernando Costa, em Pirassununga-SP. Foram considerados saudáveis todos os animais que mantiveram os resultados dos exames dentro do intervalo de referência para a espécie e faixa etária.

Os cães selecionados foram alojados em canis com 3,42m² de área coberta e com solário de 7,21m² (Figura 2), piso de concreto e paredes de azulejo, agrupados de acordo com a afinidade social (três animais por canil), previamente determinada e, acesso a água *ad libitum*. Com o intuito de promover bem-estar aos animais, estes foram soltos para socialização e atividade física, em parques gramados com área de 40m²/parque (Figura 3), duas vezes ao dia, exceto durante o período de coleta de amostras, no qual os animais ficaram alojados em seus canis para evitar a ingestão de corpos estranhos, sendo soltos em grupos para realização de atividade física e social supervisionada, em local concretado.

Figura 2 – Imagem de canil em que os cães foram alojados.



Fonte: Henríquez, 2022.

Figura 3 - Parque gramado onde os cães foram soltos.



Fonte: Henriques, 2022.

5.3. ALIMENTAÇÃO

Os cães receberam dois alimentos experimentais formulados para animais em manutenção: Alimento Controle (AC), alimento sem a adição de extrato de malte e Alimento Malte (AM), alimento com a adição de 1,0% de extrato de malte. A composição química do extrato de malte está apresentada na Tabela 1 e a proporção de ingredientes dos alimentos experimentais na Tabela 2. Com o objetivo de reduzir a variabilidade entre os tratamentos, os ingredientes utilizados foram obtidos a partir de um único lote. Após a formulação dos alimentos, os ingredientes moídos foram pesados, homogeneizados e extrusados, em uma extrusora de rosca simples E-100 (Ferraz Máquinas, Ribeirão Preto, Brasil). O extrato de malte (Dry Standard, Liotécnica Tecnologia em Alimentos S.A., São Paulo, Brasil) foi adicionado após o processo de extrusão, durante a etapa de cobertura dos *kibbles*, associado à banha suína, o palatabilizante (SPF, Symrise Pet Food, Descalvado, Brasil) e o óleo de vísceras de frango. Os alimentos foram confeccionados na fábrica de ração da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ/Unesp), localizada em Botucatu–SP (Figura 4).

Tabela 1 - Composição química do extrato de malte.

Componente	Concentração
Matéria seca (%)¹	96,97
Extrato etéreo (% em MS)¹	0,18
Proteína bruta (% em MS)¹	7,13
Matéria mineral (% em MS)¹	1,86
Ferro (mg/kg)²	0,2
Cálcio (mg/kg)²	27
Sódio (mg/kg)²	40
Potássio (mg/kg)²	430
Magnésio (mg/kg)²	80
Fósforo (mg/kg)²	155
Tiamina (mg/kg)²	0,23
Niacina (mg/kg)²	6,8
Riboflavina (mg/kg)²	0,11

Legenda: MS= matéria seca. ¹Informações obtidas em laboratório. ²Informações declaradas pelo fabricante.

Figura 4 – Extrusora (Ferraz Máquinas E-100) da Fábrica de Ração da FMVZ/Unesp, campus de Botucatu, Botucatu – SP.



Fonte: Henríquez, 2022.

Tabela 2 - Proporção de ingredientes dos alimentos experimentais.

Ingredientes (%)	Alimento	Alimento
	Controle	Malte
Milho	31,06	31,06
Farinha de vísceras	26,38	26,38
Quirera de arroz	15,00	15,00
Glúten de milho 60	7,99	7,99
Polpa de beterraba	4,00	4,00
Óleo de peixe¹	0,82	0,82
Cloreto de potássio	0,42	0,42
Premix vitamínico²	0,37	0,37
Sal	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,17	0,17
Ovo integral em pó	0,15	0,15
Premix mineral³	0,13	0,13
Antifúngico⁴	0,10	0,10
Antioxidante⁵	0,07	0,07
DL metionina 99%	0,03	0,03
Óleo de vísceras de frango	6,81	6,81
Banha suína	4,00	3,00
Palatabilizante líquido⁶	2,20	2,20
Extrato de malte	0,00	1,00

¹Óleo de peixe com 0,18% de ácido graxo eicosapentaenoico (EPA) e 0,12% de ácido graxo docosahexaenoico (DHA). ²Adição por quilograma de produto: vitamina A 18000UI, vitamina D 1200UI, vitamina E 200UI, tiamina 6mg, riboflavina 10mg, ácido pantotênico 40mg, niacina 60mg, piridoxina 6mg, ácido fólico 0,30mg, vitamina B12 0,1mg e colina 2000mg. ³Adição por quilograma de produto: ferro 100mg, cobre 10mg, manganês 10mg, zinco 150mg, iodo 2mg e selênio, 0,3mg. ⁴Fylax (Trouw nutrition, Mirassol, Brasil). ⁵agAntiox (Agrocerec Multimix, Rio Claro, Brasil). ⁶SPF (Symrise Pet Food, Descalvado, Brasil).

Foi utilizada a fórmula da necessidade energética para manutenção (NEM) dos animais, determinada pela equação: $110 \times PC^{0,75}$ (FEDIAF, 2020). Com o resultado deste cálculo foi possível determinar a quantidade de alimento que foi fornecida diariamente, dividindo-o pela energia metabolizável do alimento, estimada em 4000 kcal/kg, de acordo com o valor energético dos ingredientes utilizados. Após obter este resultado, ele foi dividido por dois, pois foram fornecidas duas refeições diárias para cada animal. A ingestão de alimento foi monitorada diariamente.

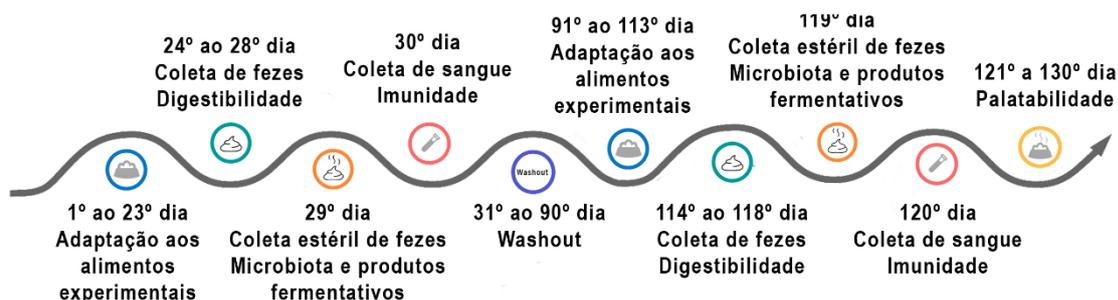
Foi realizada análise no extrato de malte para determinar a composição de amido e açúcares totais. Em relação a análise de amido, a concentração encontrada foi inferior ao limite de detecção, isso ocorre, pois durante o processo de fabricação do extrato de malte é realizada hidrólise enzimática no amido da cevada, o que resulta na transformação de todo o amido em açúcares. Já em relação a análise de açúcares totais, foi observada concentração de 70,98%; sendo 31,72% de maltose; 3,54% de glicose; 0,94% de sacarose; 0,84% de frutose e 33,94% outros açúcares. Todas essas informações foram confirmadas pela empresa fabricante do extrato de malte (Liotécnica Tecnologia em Alimentos S.A., São Paulo, Brasil). As análises de composição de amido e de açúcares totais foram realizadas de acordo com metodologia descrita pelo COMPÊNDIO (2017) (Método 24/2017), já a quantificação dos açúcares foi realizada por cromatografia líquida.

5.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi o crossover 2x2. Os 12 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. No primeiro período (duração de 30 dias), o grupo 1 (G1) recebeu o AC, enquanto o grupo 2 (G2) recebeu o AM, após o período de *washout* de 60 dias, no segundo período experimental (duração de 30 dias), o G1 recebeu o AM, enquanto o G2 recebeu o AC. Durante o período de *washout*, os cães receberam um alimento comercial seco extrusado do segmento super premium (Premier Fórmula Raças Médias, PremieRpet, Dourado, Brasil) que não continha extrato de malte em sua composição. Apesar deste alimento conter prebióticos e fibras fermentáveis (levedura seca de cervejaria, mananoligossacarídeos e parede celular de levedura) em sua composição, optou-se por utilizá-lo, pois era o mesmo que os animais consumiam antes do início do estudo.

No total, o experimento foi constituído por 130 dias, sendo os primeiros 23 dias dos períodos 1 e 2 de adaptação aos alimentos, os sete dias seguintes de coletas de fezes e sangue para análise de digestibilidade aparente dos nutrientes, escore fecal, produtos fermentativos, microbiota fecal e imunidade, e os últimos 10 dias para avaliação da palatabilidade (Figura 5).

Figura 5 - Cronograma dos períodos experimentais.



5.5. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E ESCORE FECAL

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes dos alimentos foram determinados pelo método de coleta total de fezes, segundo recomendações da AAFCO (2019). O consumo de alimento foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. Durante cinco dias, as fezes foram coletadas integralmente após totalização de 24 horas do fornecimento do alimento. Estas foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados e, armazenadas em freezer (-15°C) para posterior análise. Ao final dos períodos de coletas, as fezes foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única (*pool* fecal) por animal. Posteriormente, foram pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi MA035/2, Piracicaba, Brasil) (Figura 6) na temperatura de 55°C, por 72 horas (AOAC, 2006). As fezes pré-secas foram então moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi MA340, Piracicaba, Brasil) (Figura 7), com peneira de 1mm e, posteriormente, em moinho de micro-facas (Marconi MA048, Piracicaba, Brasil) (Figura 7). As amostras de alimento foram moídas em moinho analítico (Ika A11 Basic Mill, Staufen, Alemanha) (Figura 7).

Figura 6 - Estufa de ventilação forçada 55°C (Marconi MA035/2).



Fonte: Henríquez, 2022.

Figura 7 - A: Moinho de facas tipo Willey (Marconi MA340); B: Moinho de micro facas (Marconi MA048); C: Moinho analítico (Ika, A11 Basic Mill).



Fonte: Henríquez, 2022.

Após as moagens, foram retiradas subamostras para a determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB), das fezes e dos alimentos, segundo as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995), e os teores de cálcio (Ca) e fósforo (P) dos alimentos (AOAC, 1995). Os extrativos não-nitrogenados (ENN) foram calculados, pela seguinte fórmula:

$$\text{ENN\%} = \text{MS} - (\text{PB} + \text{EEHA} + \text{FB} + \text{MM})$$

A matéria orgânica (MO) foi calculada pela fórmula:

$$\text{MO\%} = \text{MS} - \text{MM}$$

Todas as análises foram realizadas em duplicata, com exceção da FB que foi realizada em triplicata. A determinação destas ocorreu no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), situado no campus Fernando Costa em Pirassununga-SP,

Para a determinação de MS, foram pesadas subamostras de dois gramas em balança analítica, que foram colocadas em uma estufa a 105°C (Fanem 315, São Paulo, Brasil) (Figura 8) durante 8 horas. Após esse período as amostras foram pesadas novamente e, por diferença, foi obtido o valor de MS.

Figura 8 - Estufa 105°C (Fanem 315).

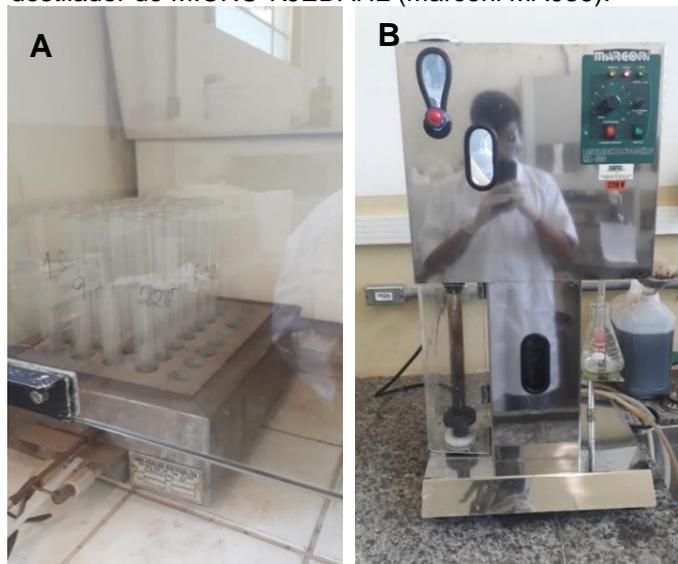


Fonte: Henríquez, 2022.

A PB foi estimada a partir da concentração de nitrogênio orgânico presente nas amostras. Para esta análise, foram pesadas subamostras de 100 miligramas em balança analítica, que na sequência passaram por processo de digestão durante duas horas, por meio da adição de 3mL de ácido sulfúrico e 1g

de uma mistura (9:1) de sulfato de sódio anidro e sulfato de cobre, que serviu como catalisador. Após este processo, foram adicionados 35mL de água destilada e as amostras foram colocadas no aparelho destilador de Micro-kjedahl (Marconi MA036, Piracicaba, Brasil) (Figura 9), em seguida, foi adicionado 15mL de hidróxido de sódio 40%. Por fim, elas foram destiladas com uma solução de ácido clorídrico a 0,02 N. Para o cálculo da PB, foi utilizada a constante 6,25, pelo fato das moléculas de proteína conterem em média 16% de nitrogênio.

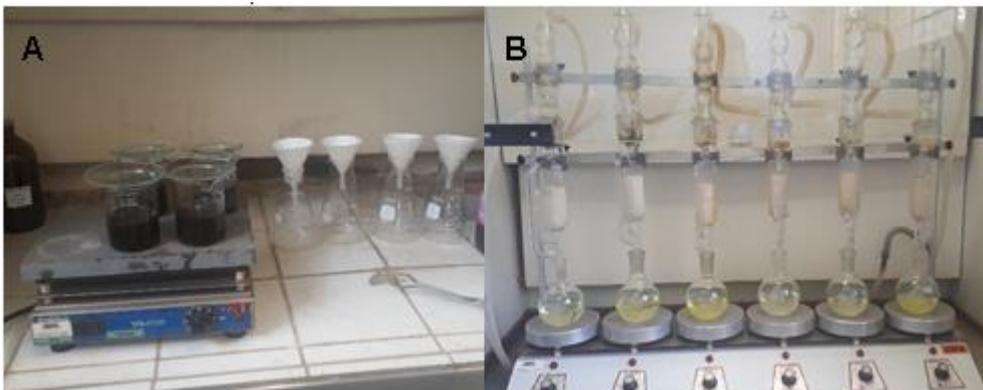
Figura 9 - A: Bloco digestor de proteína; B: aparelho destilador de MICRO-KJEDAHL (Marconi MA036).



Fonte: Henríquez, 2022.

Para determinação do EEHA, foram pesadas subamostras de três gramas, que na sequência foram submetidos ao processo de hidrólise ácida, por meio da fervura das subamostras e 75mL de solução de ácido clorídrico 14,8%, durante 45 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo. Após a secagem, foram inseridas em um aparelho extrator tipo Soxhlet fracionado com seis provas (Marconi MA487/6/250, Piracicaba, Brasil) (Figura 10), por no mínimo sete horas, para serem desengorduradas através do éter de petróleo.

Figura 10 - A: Processo de hidrólise ácida; B: Aparelho extrator tipo Soxhlet fracionado com seis provas (Marconi MA487/6/250).



Fonte: Henríquez, 2022.

Para determinar o teor de MM das amostras, foram pesados em balança analítica dois gramas, que posteriormente foram colocados em um forno tipo mufla (Marconi MA385/3, Piracicaba, Brasil) (Figura 11) a 500°C, durante quatro horas. Após esse período, as amostras foram pesadas novamente e, por diferença, foi obtido o valor de MM.

Figura 11 - Forno tipo mufla (Marconi MA385/3).

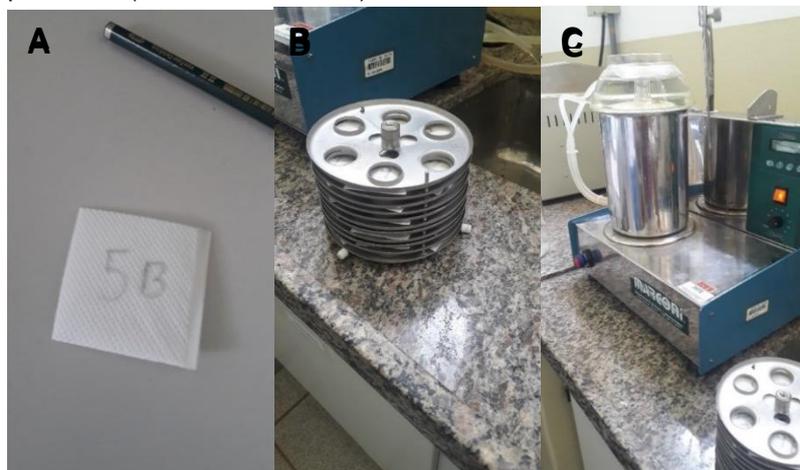


Fonte: Henríquez, 2022.

Para quantificação da FB foram pesadas subamostras de 500 microgramas, em balança analítica, que foram colocadas em *bags* específicos e depois em um digestor para fibra (Marconi MA444/CI, Piracicaba, Brasil) (Figura 12), no qual, as amostras foram submetidas, primeiramente, à digestão ácida com uma solução de ácido sulfúrico 1,25% e, posteriormente, à digestão básica com uma solução de hidróxido de sódio 1,25%; durante 30 minutos cada. Após

cada digestão, foram realizadas três lavagens com água destilada, cada uma com duração de cinco minutos. As duas digestões e as seis lavagens realizadas durante este procedimento foram a 95°C.

Figura 12 - A: *Bag* utilizado para colocar amostra; B e C: Digestor para fibra (Marconi MA444/Cl).



Fonte: Henríquez, 2022.

Baseado nos resultados obtidos em laboratório e após a correção para MS, foram calculados os CDA da MS, MO, PB, EEHA, FB e ENN dos alimentos. Estes cálculos foram realizados através da seguinte fórmula:

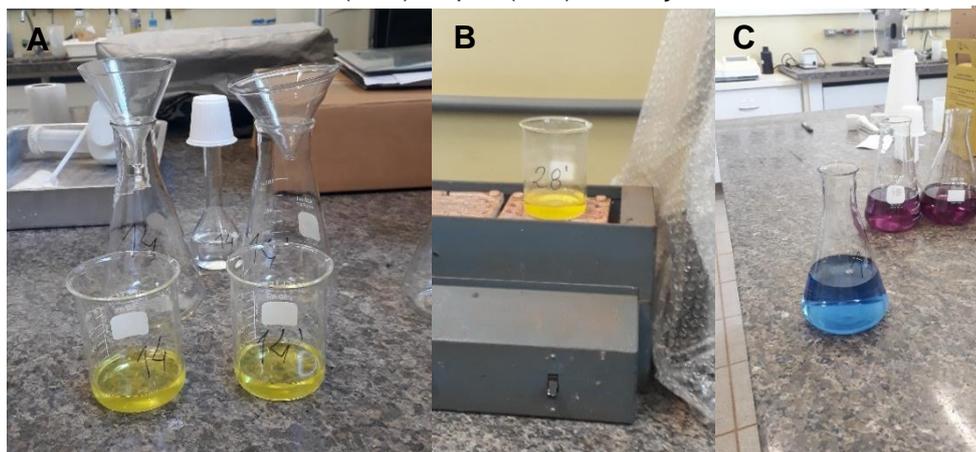
$$\text{CDA}\% = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

Para as análises de Ca e P nos alimentos, foram pesadas subamostras de dois gramas, em balança analítica, que foram colocadas em forno tipo mufla (Marconi MA385/3, Piracicaba, Brasil) a 500°C durante quatro horas. Em seguida, iniciou-se o preparo da solução mineral através da adição de 20mL de ácido clorídrico. Após 20 minutos, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo em um balão volumétrico de 100mL e adicionou-se água destilada para completar o volume.

Para a quantificação do Ca, foi pipetada uma alíquota de 20mL da solução mineral em um Becker de 250mL e foi adicionado 20mL de molibdato de amônio 5% e 1mL de ácido clorídrico 10%. A solução formada foi fervida a 80°C para precipitação do cálcio. Após este processo, a solução foi filtrada em papel filtro

quantitativo e adicionou-se 20mL de hidróxido de sódio 4N, 5mL de cianeto de potássio 0,1N; 5mL de trietanolamina 20% e água destilada para completar o volume de 300mL. Também foi adicionado calcon, para atuar como indicador. Por último, a solução foi destilada com EDTA 0,02N (Figura 13).

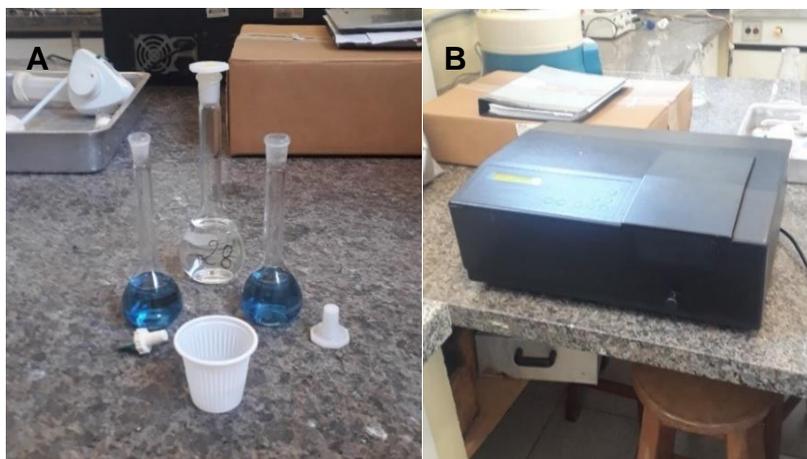
Figura 13 - A: Preparo da solução para análise de cálcio; B: Fervura da solução de cálcio; C: Amostra antes (roxo) e após (azul) a titulação com EDTA.



Fonte: Henríquez, 2022.

Para a análise de P foi pipetada uma alíquota de 0,2mL em um balão volumétrico de 50mL. Foram adicionados 20mL de água destilada, 5mL de solução de molibdato de amônio e 2mL de vitamina C 2%. Após cinco minutos, realizou-se a leitura da amostra em absorbância, com comprimento de ondas de 670nm, em um espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer, Piracicaba, Brasil) (Figura 14).

Figura 14 - A: Preparo da amostra para análise de fósforo; B: Espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer).



Fonte: Henríquez, 2022.

O escore fecal foi avaliado de acordo com a escala publicada pelo Centro de Pesquisa da Waltham (2000). Ao longo do período de coleta de fezes para a digestibilidade, foram atribuídos valores de 0 a 5, considerando-se adequado valores entre 2,0 e 2,5 (Figura 15).

Figura 15 - Escala de escore fecal utilizada no presente estudo.



Fonte: traduzido do Centro de Pesquisa da Waltham (2000).

5.6. TESTES DE PALATABILIDADE

5.6.1. Aceitabilidade

Para a realização deste teste foi oferecido um único alimento por vez aos animais e foi avaliado se estes apresentavam consumo voluntário suficiente para manter o PC. Foram comparados os resultados de AC e AM ao final do segundo período experimental. Os alimentos foram oferecidos em períodos diferentes para cada grupo experimental, ou seja, no período 1 os animais do G1 receberam o AC e os do G2 o AM e, no segundo período, os animais do G1 receberam o AM e do G2 o AC. Ao total, o teste teve duração de 60 dias.

5.6.2. Preferência

O teste de preferência foi realizado utilizando o método *two-bowl* (dois comedouros) (GRIFFIN, 2003). Os alimentos experimentais foram oferecidos aos animais, lado a lado em comedouros idênticos, ao mesmo tempo, uma vez ao dia, às 14 horas, durante 10 dias seguidos. Para evitar a lateralidade, a posição dos comedouros (direita e esquerda) foi alterada diariamente. O primeiro

comedouro ao qual o cão se aproximou quando os dois alimentos foram oferecidos foi registrado como primeira escolha.

Este teste ocorreu após o final do segundo período experimental. Para conservar os alimentos até a realização do teste, estes foram mantidos em embalagens fechadas em uma sala escura sem a presença de umidade.

5.7. AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS FERMENTATIVOS

5.7.1. Determinação das concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta e cadeia ramificada

Para estas análises, foram coletadas de maneira estéril amostras de fezes no 29º dia de cada período experimental. Após coletadas, elas foram homogeneizadas e foram pesados três gramas de cada amostra, que foram diluídos em 9mL de ácido fórmico a 16%. Essas misturas foram mantidas pelo período de sete dias em refrigerador (5°C) e, foram homogeneizadas diariamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas, em centrífuga refrigerada (Sorvall Legend MACH 1.6 R, Alemanha) (Figura 16), por 15 minutos à 15°C em 5.000 rpm, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o sedimento, sendo este procedimento repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C).

Figura 16 - Centrífuga refrigerada (Sorvall Legend MACH 1.6 R).



Fonte: Henríquez, 2022.

As determinações dos AGCC e AGCR foram realizadas por cromatografia gasosa, de acordo com Ferreira et al. (2016). Para estas análises, 0,4mL do sobrenadante foi transferido para um frasco de cromatografia e adicionado

0,2mL de uma solução 3:1 de ácido metafosfórico e ácido fórmico (solução de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100%). O padrão interno foi adicionado a cada frasco (0,2mL de ácido 2-etil-butírico 100mM). Posteriormente, o extrato sobrenadante ($\pm 1,2\text{mL}$) de cada amostra foi transferido para frascos cromatográficos. Desse extrato, $1\mu\text{L}$ foi injetado em um cromatógrafo de gás (GC HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) (Figura 17) equipado com uma coluna capilar HP-FFAP (1909F-112; 25m; 0,32mm; 0,5 μm ; JeW Agilent Technologies). A injeção foi realizada automaticamente pelo sistema. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, mantido a uma taxa de fluxo de 31,35mL/min. A temperatura do injetor e do detector foi de 260°C. O tempo cromatográfico total de corrida foi de 16,5 minutos, dividido em três ciclos de aquecimento: 80°C, 120°C e 205°C. A concentração de ácidos graxos (mM) foi calculada com base em uma curva de calibração externa com ácido acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico realizada com padrões cromatográficos (FERREIRA et al., 2016). Esta análise foi realizada no Laboratório ESALQLAB da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), localizado em Piracicaba-SP.

Para determinar os AGCC totais foram somados os resultados de ácidos graxos acético, propiônico e butírico, já para os AGCR totais os ácidos graxos valérico, isovalérico e isobutírico. Por fim, para determinar os ácidos graxos totais foram somados os valores de AGCC totais e AGCR totais.

Figura 17 - Cromatógrafo gasoso (GC HP 7890A).



Fonte: Henríquez, 2022.

5.7.2. Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal fecal

Para quantificação do nitrogênio amoniacal fecal, foram coletadas amostras de fezes de forma estéril no 29º dia de cada período experimental. Após a coleta, três gramas foram diluídos em 9mL de ácido fórmico a 16%. Essas misturas foram mantidas pelo período de sete dias em refrigerador (5°C) e, foram homogeneizadas diariamente. Após este período, as amostras foram centrifugadas, em centrífuga refrigerada (Sorvall Legend MACH 1.6 R, Alemanha) (Figura 16), 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).

Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e, em seguida, alíquotas de 2mL foram diluídas em 13mL de água destilada e submetidas a um aparelho destilador de MICRO-KJEDAHL (Marconi MA036, Piracicaba, Brasil) (Figura 18). A destilação foi realizada com 5mL de solução 2N de hidróxido de potássio e, a titulação com ácido clorídrico 0,005mol/L, conforme descrito por Vieira (1980). Estas análises foram realizadas em duplicata no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), situado no campus Fernando Costa em Pirassununga-SP.

Figura 18 - Processo de destilação de nitrogênio.

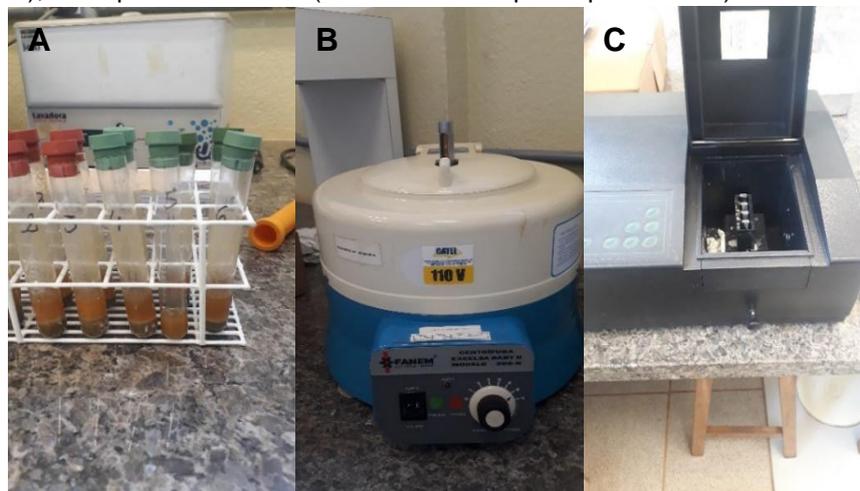


Fonte: Henríquez, 2022.

5.7.3. Determinação do ácido láctico fecal

Para esta análise, foram coletadas de forma estéril, amostras de fezes e foi pesado um grama. Cada amostra foi homogeneizada e misturada com 2mL de água destilada (1:2 p/v). Essas misturas foram mantidas pelo período de três dias em refrigerador (5°C) e foram homogeneizadas diariamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas, durante 5 minutos, a 2852 rpm (Fanem 206-R Centrífuga Excelsa Baby II, São Paulo, Brasil) (Figura 19) aproveitando-se o sobrenadante. Em um tubo de ensaio foi colocado 1mL do sobrenadante e 6mL de ácido sulfúrico, que após serem agitados foram colocados em água fervente a 80°C durante três minutos. Após os tubos esfriarem, foi adicionado 0,1mL de uma solução que continha 1,5 grama de p-hidroxibifenil e 100mL de dimetilformamida e, os tubos foram colocados novamente em água fervente a 80°C durante 90 segundos. O ácido láctico foi mensurado segundo a metodologia descrita por Pryce (1969), através do método de espectrofotometria a 565nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente com o objetivo de calibrar o espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer, Piracicaba, Brasil) (Figura 19). As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%. Estas análises foram realizadas em triplicata no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), situado no campus Fernando Costa em Pirassununga-SP.

Figura 19 - A: Amostras após centrifugação; B: Centrífuga (Fanem 206-R); C: Espectrofotômetro (Nova 2000UV Spectrophotometer).



Fonte: Henríquez, 2022.

5.7.4. Determinação do pH fecal

Para esta análise, foram coletadas fezes de forma estéril. A avaliação do pH foi realizada em pHmetro digital de bancada com eletrodo autônomo (STARTER 3100, PH BENCH, OHAUS São Paulo/SP) (Figura 20). Foi realizada introdução direta do eletrodo em uma solução 9:1 de água destilada e fezes, sendo pesado um grama de fezes, o qual foi diluído em 9mL de água destilada. Posteriormente, foi mensurado o pH da solução, conforme metodologia adaptada de Walter, Silva e Perdomo (2005). Esta análise foi realizada no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos do Departamento de Nutrição e Produção Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, situado no campus Fernando Costa, em Pirassununga-SP.

Figura 20 - pHmetro de bancada (STARTER 3100).



Fonte: Henriquez, 2022.

5.8. AVALIAÇÃO DO SISTEMA IMUNE

5.8.1. Teste de proliferação de linfócitos

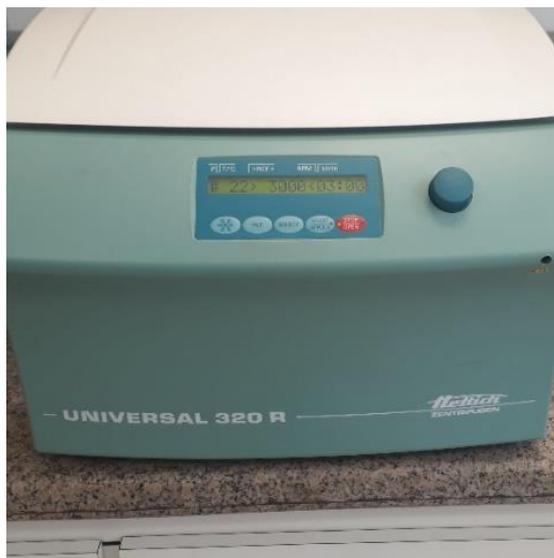
Para este teste, foi coletado 1mL de sangue no 30º dia de cada período experimental, de modo asséptico, da veia jugular dos animais, que foi armazenado em frasco com heparina de lítio. O sangue coletado foi diluído na proporção de 1mL de sangue para 3mL de tampão fosfato salino (PBS) em um tubo cônico de centrifugação de 15mL estéril. Posteriormente, foi adicionado ao

sangue diluído o Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare, Illinois, USA), na proporção de 1:2, respectivamente.

O constituinte foi centrifugado por 25 minutos a 900G e 20°C, em uma centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha) (Figura 21). A banda de linfócitos que foi obtida, foi transferida para outro tubo cônico de centrifugação de 15mL adicionada de 10mL de PBS e foi centrifugada novamente por cinco minutos a 300G e 8°C. Ao final da segunda centrifugação, o material sobrenadante foi dispensado e foi realizada uma nova centrifugação similar a segunda. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante foi dispensado novamente e foi elaborada uma solução com o material coletado: 900µg de soro fetal bovino e 100µg de dimetilsulfóxido hibri-max.

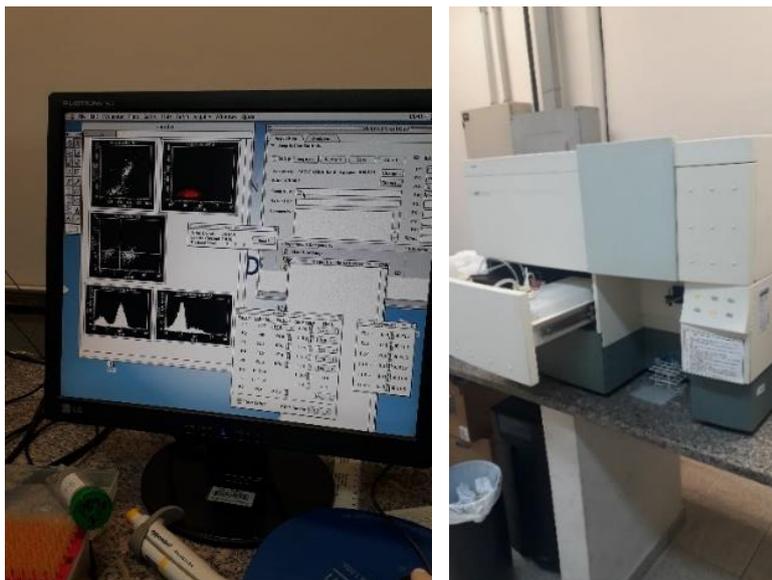
O ensaio foi conduzido em placas para microtitulação de 96 poços e fundo em “U”. Os linfócitos sanguíneos foram obtidos pela separação em partículas de ferro e, após purificação e lavagens em meio RPMI-1640, foram adicionados aos poços em concentração equivalente a 1×10^5 células em 200µL/poço. O mitógeno utilizado foi a FHA. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Decorrido o tempo de incubação, as células foram coletadas e a avaliação da proliferação foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson, Califórnia, Estados Unidos) (Figura 22). Para a análise dos dados de fluorescência, foram considerados os valores da porcentagem de divisões linfocitárias e o índice de proliferação celular dos linfócitos. Para a obtenção e análise dos resultados, foi utilizado o *software* CellQuest® (Becton Dickinson and Company, USA). Esta análise foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, situado na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo–SP.

Figura 21 - Centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804R).



Fonte: Henríquez, 2022.

Figura 22 - Citômetro de fluxo (Becton Dickinson FACSCalibur).



Fonte: Henríquez, 2022.

Para determinação do índice de proliferação, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de proliferação} = \frac{\text{proliferação de células tratadas com FHA}}{\text{proliferação de células não tratadas com FHA}}$$

Para determinar a taxa de proliferação foi utilizada a mesma fórmula, entretanto, o resultado foi multiplicado por 10.

5.8.2. Imunofenotipagem de linfócitos

Foi coletado 1mL de sangue, no 30º dia de cada período experimental, da veia jugular dos animais para realização deste teste. As amostras sanguíneas foram diluídas com PBS na proporção de 1:1. Em um tubo cônico de centrifugação de 15mL estéril foi colocado 2mL do gradiente de densidade Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare, Illinois, USA) e 2mL do sangue diluído.

O constituinte foi centrifugado por 20 minutos à 400G e 20°C para a separação de células mononucleares de interface. Foram avaliados o número de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), T citotóxicos (CD8⁺) *naïves* e a relação CD4⁺/CD8⁺. As células mononucleares (2 x 10⁵ células/mL) foram incubadas em microtubos (1,5mL) com os anticorpos CD4⁺ (1:10) e CD8⁺ (1:20) (Alexa Fluor® 647 anti Dog CD3:FITC/CD4:RPE/CD8 647, Bio-Rad) e diluídas em 100µL de tampão para citometria (PBS contendo 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Foram incluídos no ensaio os anticorpos isotipos para definição da região negativa (*background*).

As células foram incubadas por 30 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 volume de 1000µL/microtubo. Por fim, as células foram ressuspendidas em 500µL de PBS. Foi selecionada como população de linfócitos a população de células com baixo tamanho e baixa complexidade 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 realizadas pela técnica de citometria de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Califórnia, Estados Unidos) (Figura 20). Estas análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, situado na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, São Paulo – SP.

Para determinar a relação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Relação CD4: CD8} = \frac{\text{porcentagem de células T CD4}}{\text{porcentagem de células T CD8}}$$

5.9. DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL

Foram coletadas amostras fecais para esta análise, com o uso de luva estéril. Após a coleta, as fezes foram armazenadas em tubos criogênicos e congeladas em freezer (-80°C).

A determinação da população de bactérias fecais foi realizada por meio da tecnologia de sequenciamento Illumina. A extração do DNA total foi realizada por meio do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research cód. D6005). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3µM de oligonucleotídeo forward, 0,3µM de oligonucleotídeo reverse, 1µL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) e comprovadas por eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v) ~400bp (tamanho do *amplicon*). A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina).

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando *bead* magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Após essa etapa, realizou-se a quantificação pela metodologia de PCR em Tempo Real utilizando Kit KAPAKK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal). Foi gerado um *pool* equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 3nM, para realização do sequenciamento, utilizando-se o sistema Illumina MiniSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiniSeq Reagent Output MID 300 ciclos – leitura de 2 x 150pb.

A bioinformática da microbiota fecal foi realizada com QIIME 2 2021.4 (BOLYEN et al., 2019). Os dados de sequência bruta foram desmultiplexados e filtrados por qualidade usando o *plugin* q2-demux seguido por "*denoising*" com DADA2 (CALLAHAN et al., 2016) (via q2-dada2). Todas as variantes de sequência de amplicon (ASVs) foram alinhadas com *mafft* (KATOY et al., 2002) (via alinhamento q2) e usadas para construir uma filogenia com *fasttree2* (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010) (via q2-filogenia). Métricas de diversidade alfa [características observadas e diversidade filogenética de Faith (FAITH, 1992)], métricas de diversidade beta [UniFrac ponderado (LOZUPONE et al., 2007)], UniFrac não ponderado (LOZUPONE; KNIGHT, 2005), distância de Jaccard,

dissimilaridade de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957) e análise de coordenadas principais foram estimados usando diversidade q_2 , depois que as amostras foram rarefeitas (subamostradas sem substituição) para 40607 sequências por amostra. A taxonomia foi atribuída aos ASVs por meio do classificador de características q_2 (BOKULICH et al., 2018), classificador de taxonomia de *Bayes naïve classify-sklearn* contra as sequências de referência de Greengenes 13_8 99% OTUs (MCDONALD et al., 2012). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (BPI), localizado em Botucatu-SP.

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das análises de digestibilidade, produção fecal, produtos de fermentação fecal e imunidade foram analisados no software computacional *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Foram previamente verificadas a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levine. Para as variáveis que não atenderam as premissas, foi aplicada transformação logarítmica ($\log x + 1$). A análise de variância foi realizada pelo PROC MIXED, considerando o nível de significância de 5% de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + T_i + P_j + A_k + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} = variável dependente; m = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento; P_j = efeito fixo de linha; A_k = efeito fixo de coluna; e_{ijk} = erro residual.

A análise estatística do teste de preferência foi realizada por meio da comparação entre a quantidade de vezes que cada alimento experimental foi escolhido (primeira escolha) pelos animais, pelo teste de qui-quadrado no PROC GLIMMIX (SAS, versão 9.4) com distribuição binária ($p < 0,05$).

As abundâncias observadas para cada filo, família e gênero avaliados em cada animal foram avaliadas por meio de um Modelo Linear Misto Generalizado e considerando a distribuição binomial das abundâncias de cada bactéria. Para relacionar as abundâncias observadas ao componente sistemático do modelo, foi adotada a função de ligação *logit*. Como os mesmos animais foram avaliados

em dois períodos distintos, caracterizando um típico ensaio rotacionado, adotou-se estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais. Em caso de efeitos significativos para a fonte de variação de tratamentos, apesar do Teste F ser discriminatório, adotou-se também o Teste de Tukey como procedimento de comparação de médias. Todas as análises de microbiota foram realizadas utilizando o procedimento PROC GLIMMIX, do programa SAS, versão 9.4.

6. RESULTADOS

6.1. ANIMAIS

Não foi necessária a exclusão de nenhum animal neste estudo. Todos permaneceram sadios durante os períodos experimentais e apresentaram ingestão de alimento suficiente para manutenção, sem nenhum caso de vômito ou diarreia.

O PC médio do tratamento AC foi de $13,48\text{kg}\pm 1,65$ e o ECC $5,33\pm 0,49$; já o do tratamento AM foi de $13,43\text{kg}\pm 1,95$ e o ECC $5,17\pm 0,39$. Não foi observada diferença ao se comparar o PC ($p=0,4458$) e o ECC ($p=0,1449$) dos animais de ambos os tratamentos.

6.2. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E VARIÁVEIS FECAIS

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das análises bromatológicas dos alimentos experimentais, que apresentaram composição similar.

Tabela 3 - Composição química dos alimentos experimentais.

	Tratamentos	
	AC	AM
Matéria seca (%)	95,00	94,52
	Composição química na MS (%)	
Matéria orgânica¹	95,11	95,06
Proteína bruta	29,24	30,87
Extrato etéreo em hidrólise ácida	19,59	18,81
Matéria mineral	4,89	4,94
Fibra bruta	10,00	10,47
Extrativos não-nitrogenados¹	35,92	34,92
Cálcio	0,89	0,84
Fósforo	0,68	0,64

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte; MS= matéria seca. ¹ Variáveis estimadas por fórmulas.

Não foi observada diferença entre as médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) dos nutrientes (MS, MO, PB, EEHA, MM, FB e ENN), escore fecal e produção fecal em MS após a ingestão dos alimentos experimentais pelos animais (Tabela 4).

Também não foram observadas diferenças, entre os tratamentos, em relação às concentrações de produtos fermentativos determinados nas fezes dos animais, que foram avaliados neste estudo (pH fecal, ácido lático, amônia, AGCC e AGCR), como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, produção fecal e concentração de ácido lático, amônia, ácidos graxos de cadeia curta e ramificada e pH fecais dos cães após o consumo dos alimentos experimentais.

	Tratamentos		EPM	Valor de p
	AC	AM		
Coeficientes de digestibilidade (%)				
Matéria seca	86,69	86,90	0,507	0,6561
Matéria orgânica¹	89,46	89,56	0,426	0,7808
Proteína bruta	89,50	90,15	0,426	0,1528
Extrato etéreo em hidrólise ácida	97,31	97,34	0,161	0,8564
Matéria mineral	32,91	35,62	2,558	0,3399
Fibra bruta	81,33	81,61	0,965	0,7844
Extrativos não-nitrogenados¹	87,98	87,80	0,571	0,5863
Produção fecal				
Escore fecal	2,10	2,15	0,064	0,3229
Produção de fezes (g/dia/MS)	24,65	24,19	1,679	0,6126
pH fecal	6,65	6,61	0,129	0,5583
Produtos de fermentação				
Ácido lático (mMol/kg de MS)	30,00	28,19	3,552	0,7145
Amônia (mMol/kg de MS)²	166,70	168,20	12,362	0,5232
AG totais (mMol/kg de MS)²	534,80	551,10	69,064	0,6903
AGCC (mMol/kg de MS)				
Ácido acético	316,50	331,90	45,269	0,3992
Ácido propiônico	135,80	137,10	14,189	0,8468
Ácido butírico	63,27	61,02	9,316	0,6456
AGCC totais²	515,50	530,00	65,935	0,7334
AGCR (mMol/kg de MS)				
Ácido valérico	0,84	0,70	0,777	0,3002
Ácido isovalérico	11,03	12,55	1,650	0,1734
Ácido isobutírico	7,37	7,80	1,031	0,4608
AGCR totais	19,25	21,06	3,387	0,2845

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte; MS = matéria seca; AG= ácidos graxos; AGCC= ácidos graxos de cadeia curta; AGCR= ácidos graxos de cadeia curta ramificada; EPM= erro padrão da média. ¹Variáveis estimadas por fórmulas. ²Valores foram transformados por $\text{Log } x + 1$ para a análise estatística.

6.3. TESTES PALATABILIDADE

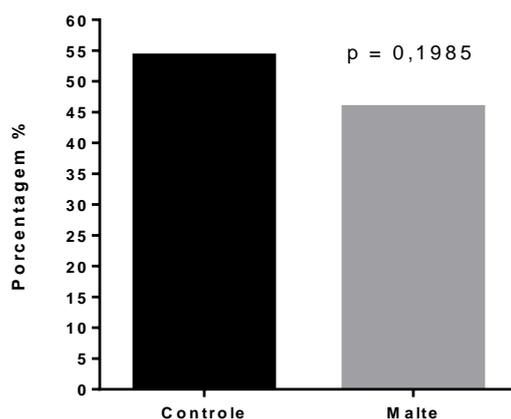
6.3.1. Aceitabilidade

Durante os dois períodos experimentais, não houve recusa de alimento e nem sobra, o que indica aceitabilidade tanto de AC quanto de AM pelos animais.

6.3.2. Preferência

Não foi observada diferença para o teste de primeira escolha ($p=0,1985$). Na Figura 23 está representada a porcentagem de vezes que os animais escolheram primeiro cada um dos alimentos, sendo 54,17% (65 vezes) o AC e 45,83% (55 vezes) o AM.

Figura 23 – Resultados em porcentagem do teste de primeira escolha.

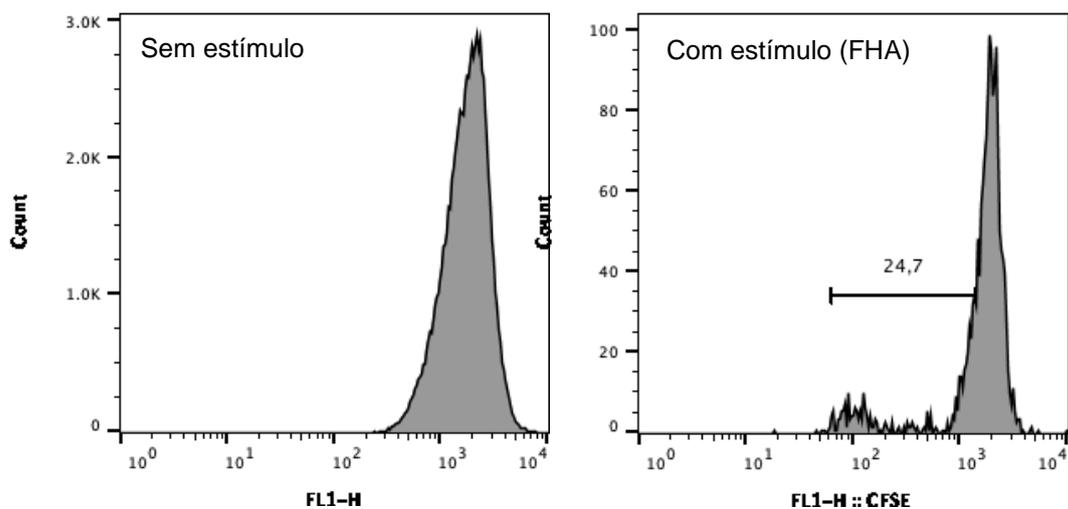


Fonte: Henríquez, 2022.

6.4. AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE

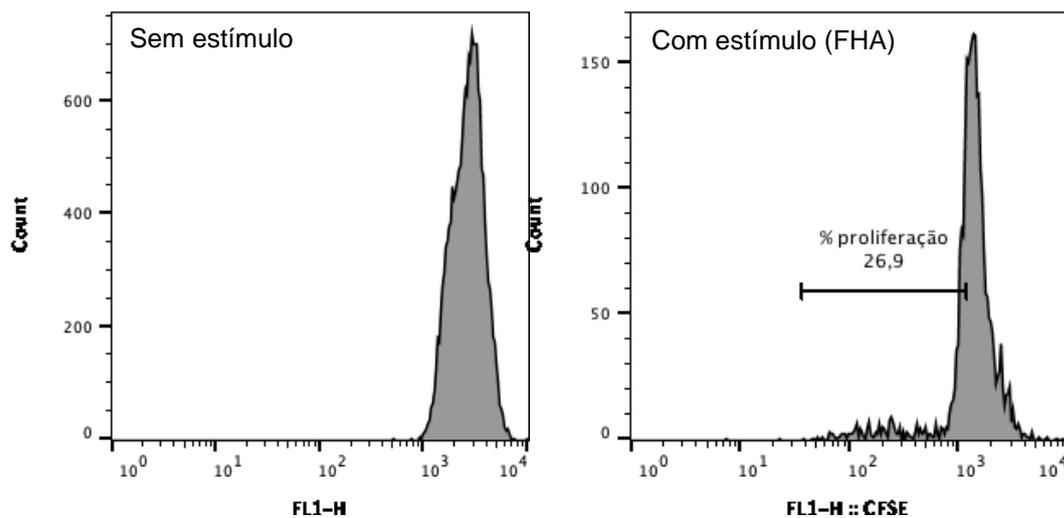
A Figura 24 ilustra o comportamento celular de proliferação de linfócitos (sem estímulo e com estímulo) em um dos animais deste estudo após o consumo do AC, enquanto a Figura 25 ilustra os mesmos resultados, porém, de um animal após o consumo do AM.

Figura 24 - Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AC.



Fonte: Henríquez, 2022.

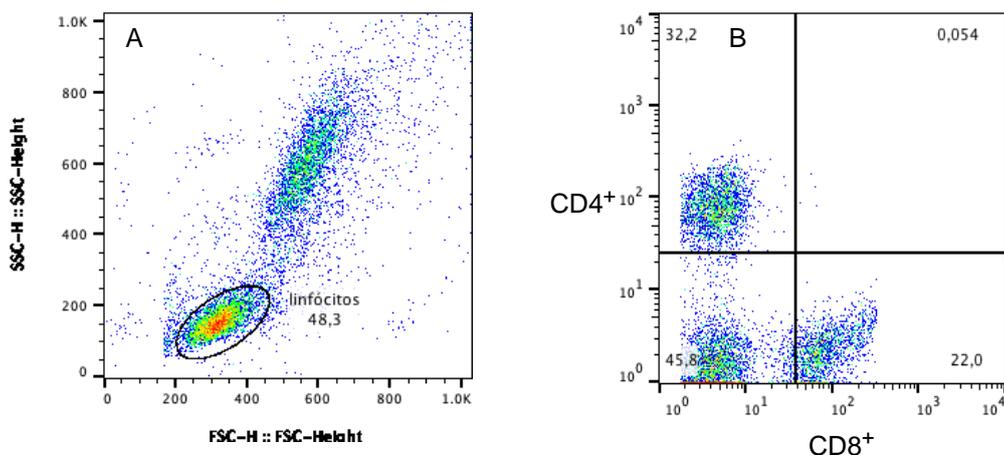
Figura 25 - Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AM.



Fonte: Henríquez, 2022.

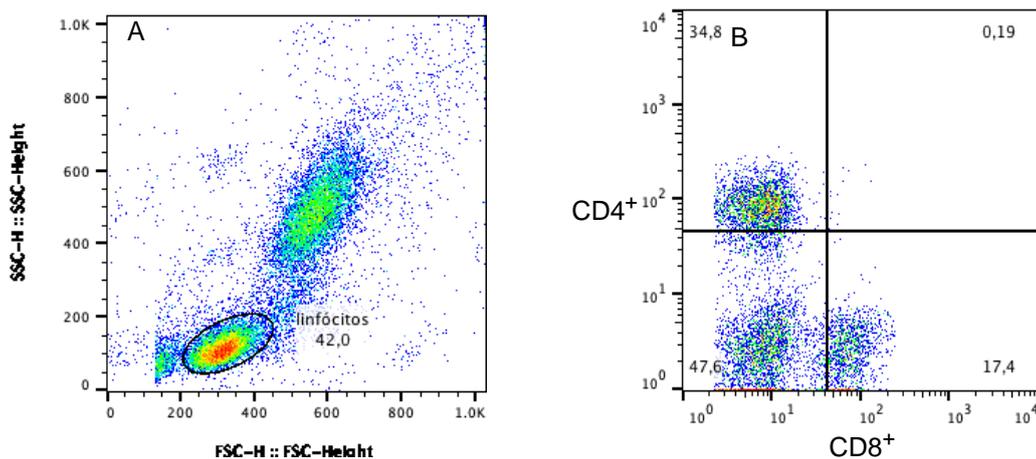
As Figuras 26 e 27 ilustram a relação dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ de cães após o consumo do AC e AM, respectivamente.

Figura 26 - A: Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AC; B: Relação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de um cão após o consumo do AC.



Fonte: Henríquez, 2022.

Figura 27 - A: Atividade de proliferação de linfócitos de um cão após o consumo do AM; B: Relação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de um cão após o consumo do AM.



Fonte: Henríquez, 2022.

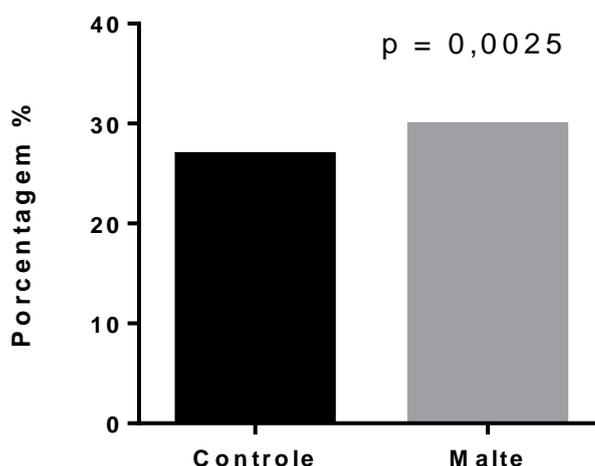
Foi observada diferença na imunidade adaptativa dos cães após o consumo do AM, quando comparado com os cães que ingeriram AC. Como demonstrado na Tabela 6, o índice ($p=0,0071$) e a taxa ($p=0,0025$) de proliferação de linfócitos (Figura 28), bem como a imunofenotipagem de linfócitos (relação CD4⁺:CD8⁺) ($p=0,0098$) foram maiores nos animais quando consumiram AM. Em relação às porcentagens referentes às populações das células T CD4⁺ ($p=0,0709$) e CD8⁺ ($p=0,1116$), não foram observadas diferenças (Tabela 6).

Tabela 5 - Resultados dos testes de índice e taxa de proliferação de linfócitos e imunofenotipagem de linfócitos (porcentagem das células T CD4⁺, T CD8⁺ e relação CD4⁺:CD8⁺) em cães após o consumo dos alimentos experimentais.

	Tratamentos		EPM	Valor de p
	AC	AM		
Índice de proliferação	2,69	2,97	0,132	0,0071
Taxa de proliferação (%)	26,85	29,84	1,343	0,0025
CD4⁺ (%)	27,60	29,21	1,286	0,0709
CD8⁺ (%)	19,55	18,16	0,870	0,1116
Relação CD4⁺:CD8⁺	1,45	1,63	0,063	0,0098

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte; EPM= erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Figura 28 - Taxa média de proliferação dos linfócitos dos dois tratamentos experimentais.



Fonte: Henríquez, 2022.

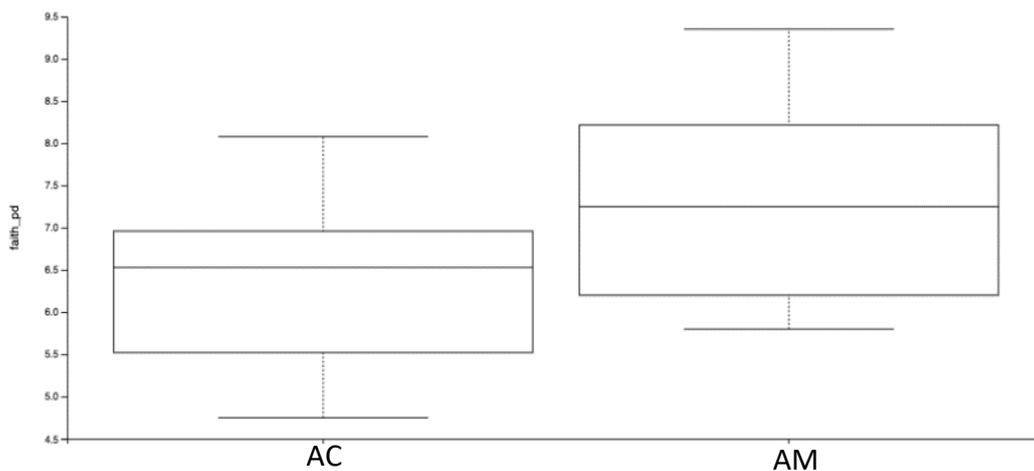
6.5. MICROBIOTA

6.5.1. Índices de diversidade

Não foram encontradas diferenças entre tratamentos para alfa ($p=0,133$) e beta-diversidade ($p=0,097$), na abundância de bactérias, por meio do índice de diversidade filogenética de Faith (*Faith's phylogenetic diversity index*) (Figura 29). A alfa-diversidade representa o número e a abundância de espécies encontradas em determinado habitat (amostra), já a beta refere-se a diferença na composição das espécies. Era esperado não encontrar diferença nestas

variáveis visto que os animais eram todos da mesma espécie e saudáveis, além de possuírem idade similar.

Figura 29 – Índice de diversidade filogenética de Faith dos grupos experimentais.

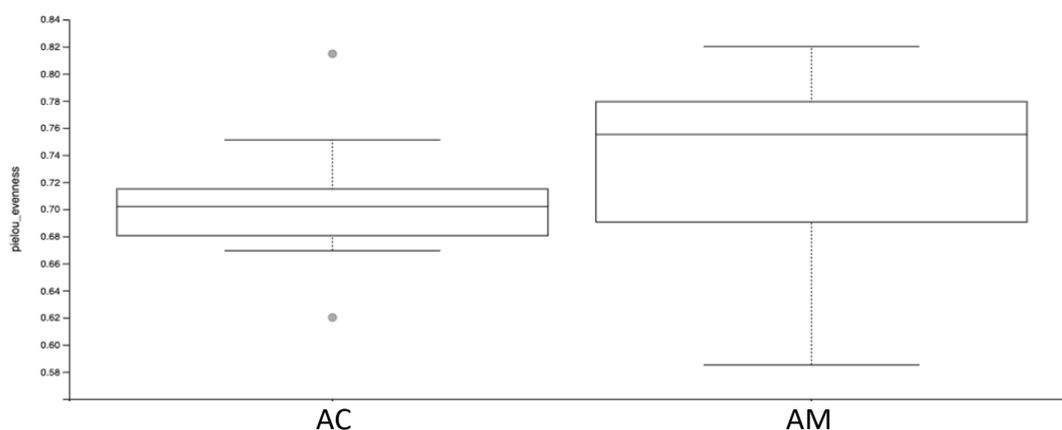


Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte.

Fonte: Henríquez, 2022.

Também não foi observada diferença para a alfa-uniformidade da microbiota dos cães incluídos neste estudo (*Pielou's evenness index*) ($p=0,326$) (Figura 30). A uniformidade é outra medida de diversidade, ela representa a homogeneidade da distribuição de abundância das espécies encontradas nas amostras. Este resultado também era esperado, pela mesma justificativa para alfa e beta-diversidade.

Figura 30- Índice de uniformidade de Pielou dos grupos experimentais.



Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte

Fonte: Henríquez, 2022.

6.5.2. Taxonomia

No total, foram identificados 7 filós, 15 classes, 40 famílias e 69 gêneros diferentes entre os dois grupos experimentais. Alguns destes foram encontrados apenas em algumas amostras, não sendo suficiente para realizar a análise estatística e por conta disso não foram utilizados.

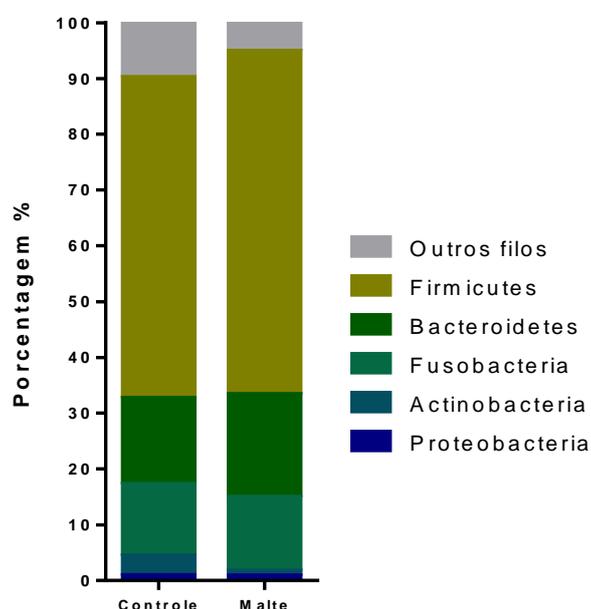
Para a análise de microbiota referente a abundância relativa de filo, foi observada diferença de tratamento para Actinobacteria ($p < 0,0001$) e Fusobacteria ($p < 0,0001$), nos quais a média do tratamento AC foi maior que do AM. Em relação aos filós Bacteroidetes ($p < 0,0001$) e Firmicutes ($p < 0,0001$) também foi observada diferença, entretanto, o tratamento AM apresentou maiores médias do que o AC (Tabela 7). Os filós Deferribacteres e Tenericutes foram identificados em algumas amostras, porém excluídos da análise estatística pelo motivo citado no começo deste tópico. A frequência relativa dos filós para cada grupo experimental está ilustrada na Figura 33.

Tabela 6 - Abundância relativa encontrada para filo nos grupos experimentais.

Filo (%)	Média dos tratamentos		Valor de p
	AC	AM	
Actinobacteria	3,54±1,81	0,87±0,46	<0,0001
Bacteroidetes	15,43±2,12	18,44±2,44	<0,0001
Firmicutes	57,51±3,10	61,51±3,00	<0,0001
Fusobacteria	18,81±1,42	13,23±1,46	0,0284
Proteobacteria	0,89±0,13	0,84±0,12	0,2911

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte.

Figura 31 - Distribuição dos filios bacterianos entre os grupos experimentais.



Fonte: Henríquez, 2022.

A abundância relativa encontrada para classe foi diferente para Bacilli ($p < 0,0001$), Erysipelotrichi ($p < 0,0001$), Firmicutes ($p < 0,0001$) e Gammaproteobacteria ($p = 0,0125$), nas quais o tratamento AC resultou em maiores médias. Já para as classes Bacteroidia ($p < 0,0001$), Betaproteobacteria ($p < 0,0001$), Clostridia ($p < 0,0001$), Coriobacteriia ($p < 0,0001$) e Fusobacteriia ($p < 0,0001$), as médias do tratamento AM foram maiores (Tabela 8). Algumas classes bacterianas como: Bacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, Epsilonproteobacteria e Mollicutes, foram excluídas da análise estatística pelo

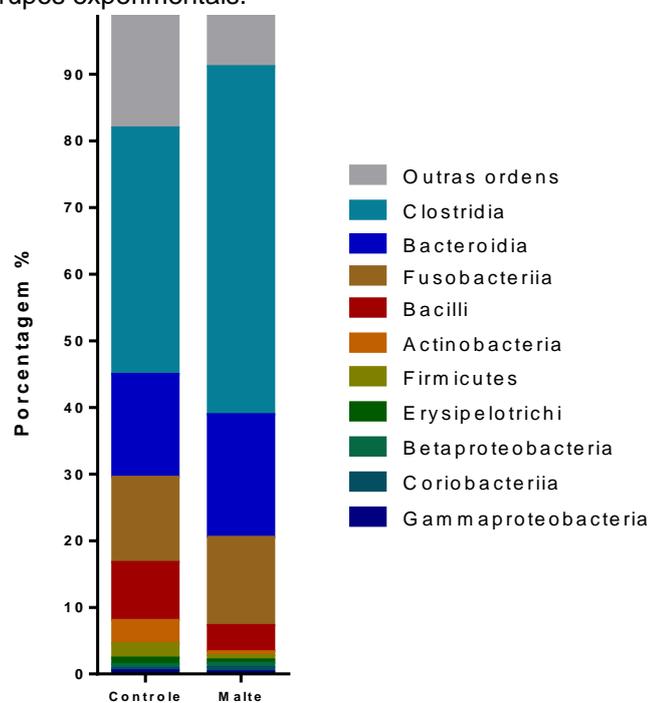
motivo já citado anteriormente. A Frequência relativa das classes de cada grupo experimental está ilustrada na Figura 34.

Tabela 7 - Abundância relativa encontrada para classe nos grupos experimentais.

Classe (%)	Média dos tratamentos		Valor de p
	AC	AM	
Actinobacteria	3,51±3,11	0,57±0,52	0,05661
Bacilli	8,71±1,63	3,95±0,78	<0,0001
Bacteroidia	15,43±2,12	18,44±2,44	<0,0001
Betaproteobacteria	0,56±0,15	0,63±0,16	<0,0001
Clostridia	36,97±4,20	52,23±4,50	<0,0001
Coriobacteriia	0,41±0,08	0,65±0,13	<0,0001
Erysipelotrichi	0,97±0,34	0,50±0,18	<0,0001
Firmicutes	2,11±0,98	0,65±0,31	<0,0001
Fusobacteriia	12,81±1,42	13,23±1,46	<0,0001
Gammaproteobacteria	0,35±0,13	0,21±0,07	0,0125

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte.

Figura 32 - Distribuição das classes bacterianas entre os grupos experimentais.



Fonte: Henríquez, 2022.

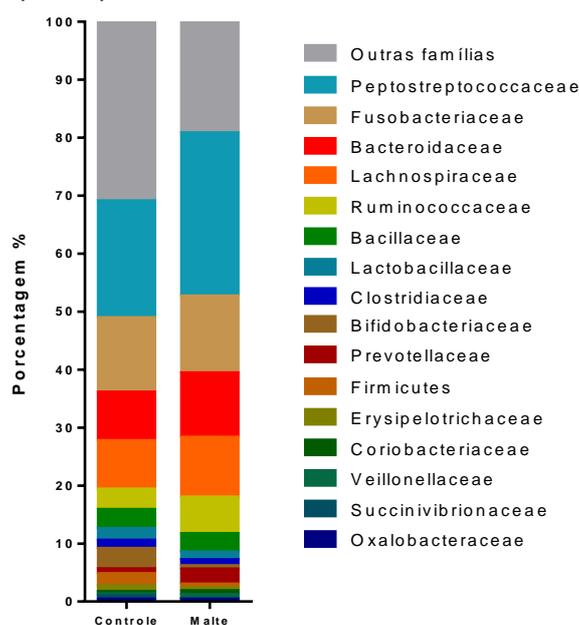
Em relação a abundância relativa encontrada para família, foi observada diferença para Bacteroidaceae ($p < 0,0001$), Coriobacteriaceae ($p < 0,0001$), Fusobacteriaceae ($p = 0,0284$), Lachnospiraceae ($p < 0,0001$), Peptostreptococcaceae ($p < 0,0001$), Prevotellaceae ($p < 0,0001$), Ruminococcaceae ($p < 0,0001$), Veillonellaceae ($p < 0,0001$), [Clostridiales] ($p = 0,0056$) e [Paraprevotellaceae] ($p = 0,0019$), nas quais o tratamento AM apresentou médias superiores ao AC. Já para as famílias Bifidobacteriaceae ($p < 0,0001$), Clostridiaceae ($p = 0,0001$), Erysipelotrichaceae ($p < 0,0001$), Firmicutes ($p < 0,0001$) e Succinivibrionaceae ($p = 0,0258$), as médias do tratamento AC foram maiores (Tabela 9). Algumas famílias, como: Anaeroplasmataceae, Bacillales, Bacilli, Bacteroidetes, Burkholderiales, Comamonadaceae, Deferribacteraceae, Enterobacteriaceae, Eubacteriaceae, Helicobacteraceae, Leuconostocaceae, Marinilabiaceae, Mycoplasmataceae, Peptococcaceae, Porphyromonadaceae, S24-7, Turicibacteraceae e outras cinco que não foram identificadas, também foram excluídas da análise estatística pelo motivo citado no começo deste tópico. A frequência relativa das famílias para cada grupo experimental está ilustrada na Figura 35.

Tabela 8 - Abundância relativa encontrada para família nos grupos experimentais.

Família (%)	Média dos tratamentos		Valor de p
	AC	AM	
Bacillaceae	3,31±1,00	3,14±0,95	0,0562
Bacteroidaceae	8,36±1,43	11,10±1,85	<0,0001
Bifidobacteriaceae	3,51±3,11	0,57±0,52	<0,0001
Clostridiaceae	1,41±0,36	1,04±0,27	0,0001
Coriobacteriaceae	0,41±0,08	0,65±0,13	<0,0001
Erysipelotrichaceae	0,97±0,34	0,50±0,18	<0,0001
Firmicutes	2,11±0,98	0,65±0,31	<0,0001
Fusobacteriaceae	12,81±1,42	13,23±1,46	0,0284
Lachnospiraceae	8,38±1,22	10,34±1,47	<0,0001
Lactobacillaceae	2,00±1,24	1,35±0,90	0,4514
Oxalobacteraceae	0,38±0,13	0,32±0,10	0,1888
Peptostreptococcaceae	20,17±2,21	28,16±2,78	<0,0001
Prevotellaceae	0,85±0,41	2,59±1,24	<0,0001
Ruminococcaceae	3,50±0,92	6,30±1,61	<0,0001
Succinivibrionaceae	0,57±0,20	0,20±0,07	0,0258
Veillonellaceae	0,32±0,07	0,64±0,14	<0,0001
[Clostridiales]	0,40±0,08	0,57±0,11	0,0056
[Paraprevotellaceae]	0,48±0,13	0,80±0,22	0,0019

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte. *Nomes que estão entre [] são famílias que não foram identificadas, entretanto, a ordem foi identificada e seu nome incluso [].

Figura 33- Distribuição das famílias bacterianas entre os grupos experimentais.



Fonte: Henríquez, 2022.

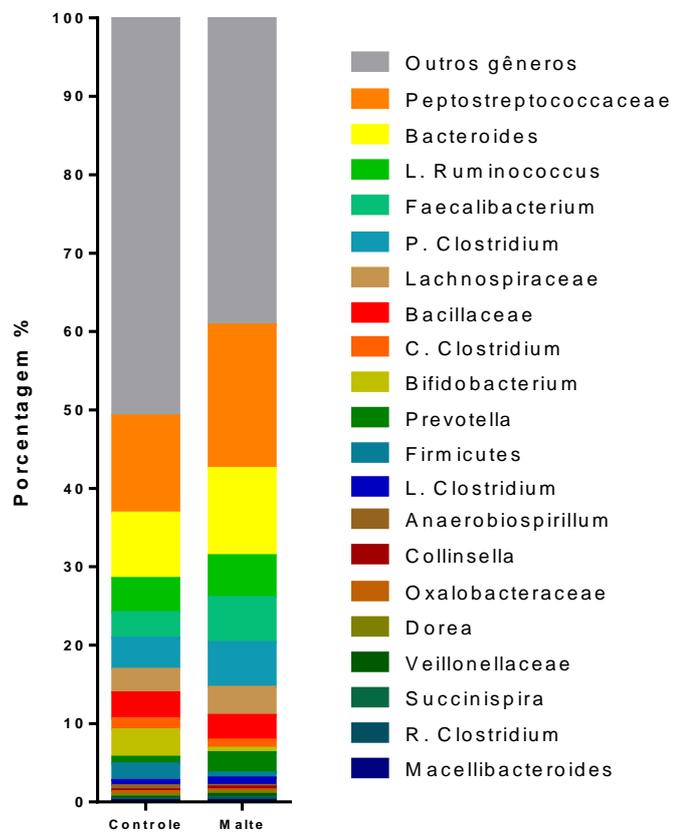
Para a abundância relativa de gênero, foi observada diferença de médias para as seguintes bactérias: *Anaerobiospirillum* ($p=0,283$), *Bifidobacterium* ($p<0,0001$), *Clostridium* (família: Clostridiaceae) ($p=0,0001$), *Firmicutes* ($p<0,0001$) e [*Erysipelotrichaceae*] ($p=0,0003$), nos quais as do tratamento AC foram maiores. Já para os gêneros *Bacteroides* ($p<0,0001$), *Collinsella* ($p=0,0006$), *Faecalibacterium* ($p<0,0001$), *Clostridium* (família: Lachnospiraceae) ($p=0,0002$), *Ruminococcus* (família: Lachnospiraceae) ($p<0,0001$), *Lachnospiraceae* ($p<0,0001$), *Clostridium* (família: Peptostreptococcaceae) ($p<0,0001$), *Peptostreptococcaceae* ($p<0,0001$), *Prevotella* ($p<0,0001$), *Clostridium* (família: Ruminococcaceae) ($p=0,0240$), *Succinispira* ($p=0,0077$), *Veillonellaceae* ($p=0,0016$), [*Clostridiales*] ($p=0,0056$), [*Fusobacteriaceae*] ($p=0,0382$), [*Prevotella*] ($p=0,0005$) e [*Ruminococcaceae*] ($p=0,0178$), o tratamento AM apresentou as maiores médias (Tabela 10). Alguns gêneros, como: *Allobaculum*, *Anaerorhabdus*, *Bacillales*, *Bacilli*, *Bacteroidales*, *Bacteroidetes*, *Barnesiella*, *Burkholderiales*, *Butyricoccus*, *Catenibacterium*, *Comamonadaceae*, *Cytophaga*, *Defluviitalea*, *Clostridium* (família: Erysipelotrichaceae), *Enterobacteriaceae*, *gut*, *Helicobacter*, *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus*, *Lactonifactor*, *Mucispirillum*, *Mycoplasma*, *Olsenella*, *Paraeggerthella*, *Pediococcus*, *Peptococcus*, *Pseudoramibacter*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* (família: Ruminococcaceae), *Roseburia*, *S24-7*, *Slackia*, *Selenomonas*, *Succinivibrionaceae*, *Turicibacter*, *Weissella* e outros seis gêneros não identificados também foram excluídos anteriormente pelo mesmo motivo já citado anteriormente. A frequência relativa dos gêneros para cada grupo experimental está ilustrada na Figura 36.

Tabela 9 - Abundância relativa encontrada para gênero nos grupos experimentais.

Gênero (%)	Média dos tratamentos		Valor de p
	AC	AM	
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,54±0,19	0,20±0,07	0,0283
<i>Bacillaceae</i>	3,31±1,00	3,14±0,95	0,0562
<i>Bacteroides</i>	8,36±1,43	11,10±1,85	<0,0001
<i>Bifidobacterium</i>	3,51±3,11	0,57±0,52	<0,0001
<i>C. Clostridium</i>	1,41±0,36	1,04±0,27	0,0001
<i>Collinsella</i>	0,21±0,05	0,35±0,09	0,0006
<i>Dorea</i>	0,34±0,04	0,27±0,03	0,1681
<i>Faecalibacterium</i>	3,27±0,89	5,77±1,52	<0,0001
<i>Firmicutes</i>	2,11±0,98	0,65±0,31	<0,0001
<i>L. Clostridium</i>	0,66±0,08	0,93±0,11	0,0002
<i>L. Ruminococcus</i>	4,35±0,79	5,34±0,96	<0,0001
<i>Lachnospiraceae</i>	3,00±0,33	3,59±0,39	<0,0001
<i>Macellibacteroides</i>	0,08±0,02	0,07±0,02	0,7339
<i>Oxalobacteraceae</i>	0,38±0,13	0,32±0,10	0,1888
<i>P. Clostridium</i>	3,95±1,02	5,69±1,44	<0,0001
<i>Peptostreptococcaceae</i>	12,37±2,21	18,30±3,04	<0,0001
<i>Prevotella</i>	0,85±0,41	2,59±1,24	<0,0001
<i>R. Clostridium</i>	0,08±0,03	0,22±0,07	0,0240
<i>Succinispira</i>	0,15±0,03	0,23±0,05	0,0077
<i>Veillonellaceae</i>	0,20±0,05	0,36±0,09	0,0016
[<i>Clostridiales</i>]	0,40±0,08	0,57±0,11	0,0056
[<i>Clostridium</i>]	1,31±0,15	1,39±0,16	0,1951
[<i>Erysipelotrichaceae</i>]	0,38±0,16	0,13±0,06	0,0003
[<i>Eubacterium</i>]	0,15±0,04	0,10±0,03	0,1123
[<i>Fusobacteriaceae</i>]	12,81±1,42	13,21±1,45	0,0382
[<i>Prevotella</i>]	0,30±0,08	0,65±0,17	0,0005
[<i>Ruminococcaceae</i>]	0,14±0,03	0,21±0,04	0,0178

Legenda: AC= alimento controle, sem adição de extrato de malte; AM= alimento com adição de 1,0% de extrato de malte. *Nomes que estão entre [] são famílias que não foram identificadas, entretanto, a ordem foi identificada e seu nome incluso nos [].

Figura 34 - Distribuição dos gêneros bacterianos entre os grupos experimentais.



Fonte: Henríquez, 2022.

7. DISCUSSÃO

A demanda dos fabricantes de alimentos para cães por ingredientes alternativos que possam ser utilizados na nutrição destes animais vem crescendo, por conta disso, estudos têm sido realizados com diferentes coprodutos derivados de alguns alimentos para avaliar os seus possíveis efeitos na nutrição destes animais (BELOSHAPKA et al., 2016). A cevada é um grão que apresenta alguns compostos de interesse, como os β -glucanos, que também estão presentes em seus coprodutos, como os grãos de malte e o extrato de malte (TOSH; BORDENAVE, 2020). Estes aspectos somados a falta de estudos na literatura com o extrato de malte para cães foram o estímulo para a realização do presente estudo sob aspectos nutricionais e funcionais nestes animais.

Era esperado que a inclusão do extrato de malte atuasse como possível palatabilizante por conta da presença de açúcares em sua composição e consequente sabor adocicado (DUKE; HENSON, 2008; REICHEL et al., 2021), entretanto, isso não alterou a aceitação e a palatabilidade. O teor de inclusão no alimento (1,0% da matéria natural) ou a forma de inclusão (cobertura, após a extrusão) podem ter influenciado neste resultado, porém, a falta de estudos na literatura dificulta a interpretação destes dados.

No presente estudo também não foram observadas diferenças para as variáveis: CDAs dos nutrientes, escore fecal, produção fecal e produtos fermentativos nas fezes. Por outro lado, foram observadas diferenças para as variáveis de imunidade e microbiota fecal, o que pode demonstrar ação prebiótica do extrato de malte. O consumo de prebióticos, geralmente, resulta no aumento da produção de AGCC e ácido lático, que podem promover benefícios ao hospedeiro, como melhora da resposta do sistema imune (DENG; SWANSON, 2015), no entanto, sabe-se que os prebióticos podem atuar por diferentes mecanismos de ação (STERCOVA et al., 2016; LIN et al., 2019; THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020).

Alguns autores, ao avaliarem a suplementação de diferentes prebióticos na alimentação de cães, relataram resultados similares aos encontrados no presente estudo para as variáveis de produção fecal e escore fecal, as quais não foram alteradas em cães saudáveis após a ingestão de alimentos que continham estes aditivos (NOGUEIRA et al., 2019; THEODORO et al., 2019; PERINI et al., 2020; RENTAS et al., 2020). Sabe-se que o tipo e a concentração de prebióticos

adicionados ao alimento podem alterar a produção e o escore fecal (GOMES, 2009), pois a fermentação de carboidratos é um fator que está associado à produção de AGCC, os quais em alta concentração, podem influenciar na absorção de água por efeito osmótico e aumentar o teor de água nas fezes e, por consequência, alterar o escore fecal (NRC, 2006). Apesar do escore fecal ser um método subjetivo para avaliação da qualidade das fezes, este parâmetro foi empregado em diferentes estudos que avaliaram prebióticos para cães (THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Tutores de cães, principalmente aqueles que possuem animais que vivem *indoor*, observam a qualidade das fezes de seus animais e esta característica pode ser um critério utilizado no momento de escolha de um alimento comercial.

A ingestão do extrato de malte pelos cães não ter influenciado nos CDAs dos diferentes nutrientes avaliados no presente estudo (MS, MM, PB, EEHA e FB) demonstra que este aditivo não alterou a absorção de nenhum deles. Na literatura foram localizados outros estudos com cães nos quais também não foram observadas alterações nessas variáveis após a ingestão de prebióticos comumente utilizados na nutrição desses animais, como β -glucanos, frutooligosacarídeos e mananoligosacarídeos (SWANSON et al., 2002a; RENTAS et al., 2020). Por outro lado, também já foi observado que a suplementação de alguns prebióticos no alimento de cães pode alterar o CDA de um ou mais nutrientes (FLICKINGER et al., 2003). Em um estudo realizado com cães saudáveis por Theodoro et al. (2019) foi observado que após o fornecimento de um alimento que continha parede celular de levedura com 20% de mananoligosacarídeos solúveis em sua composição, ocorreu redução no CDA do EEHA quando comparado com o grupo controle e o grupo que ingeriu apenas a parede celular de levedura. Em outro estudo realizado por Kore et al. (2012), foi observado aumento do CDA da FB em cães saudáveis, após a ingestão de um alimento que continha 1,0% de mananoligosacarídeos, quando comparado com o grupo controle.

O consumo de prebióticos altera a composição do microbioma intestinal, pois estes servem de substrato fermentativo para algumas bactérias, o que ocasiona no aumento da população destas (HANDL et al., 2013; DENG; SWANSON, 2015). Em relação a estes resultados, o filo Firmicutes foi o que apresentou maior abundância relativa para ambos os tratamentos, sendo está

maior no AM do que no AC. Dentro deste são encontrados grupos bacterianos, principalmente dentro da classe Clostridia, que são conhecidos por beneficiarem a saúde da mucosa, pois produzem ácido butírico através da fermentação (LI et al., 2017). Já foram encontrados diferentes valores de abundância relativa para este filo quando avaliada a microbiota fecal de cães saudáveis. Alguns trabalhos apontaram que a população compreendia uma abundância superior a 90% (HANDL et al., 2011, 2013), enquanto em outros foram encontrados valores similares aos do presente estudo (BELOSHAPKA et al., 2013; MACEDO et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

A variação dos resultados publicados nos diferentes trabalhos pode ser explicada em partes pelas metodologias utilizadas. Por mais que alguns estudos tenham empregado sequenciamento Illumina, existem diferentes *primers* que podem ser utilizados, o que influencia no resultado (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016). Outras justificativas para essa variação são a forma de coleta das amostras e a variação diária da microbiota fecal que pode ocorrer em cães, como relatado por Garcia-Mazcorro et al. (2012). Além disso, a população de microrganismos não é a mesma nas diferentes seções do intestino, como observado por Deng e Swanson (2015). Swanson et al. (2002c) observaram que os microrganismos encontrados no íleo e nas fezes de cães também diferem. O uso de diferentes *primers* e a variação diária do microbioma intestinal podem ser considerados como limitações da análise de microbiota fecal de cães e outras espécies. O delineamento *crossover* 2x2 utilizado no presente estudo, foi escolhido com o intuito de minimizar estas limitações, pois neste delineamento os animais passam pelos dois tratamentos e, por consequência, acabam participando do grupo controle e tratado, o que também contribui para o aumento das unidades experimentais.

Em alguns estudos, o filo Bacteroidetes foi o segundo mais abundante nas fezes dos cães (HANDL et al., 2011; MACEDO et al., 2022). No presente trabalho, este filo foi observado em maior abundância nas fezes dos cães do grupo AM. O grupo controle apresentou como segundo filo predominante o Fusobacteria, seguido do Bacteroidetes. Os outros filios mais abundantes nas fezes de cães também foram observados neste estudo, sendo eles: Actinobacteria e Proteobacteria (HANDL et al., 2013; MACEDO et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

Dentre os gêneros que compõe o filo Bacteroidetes, o *Prevotella* e o *Bacteroides* apresentaram maior abundância nas fezes dos cães que receberam o tratamento AM, o que está de acordo com o achado deste tratamento resultar em maior abundância do filo Bacteroidetes. Em outros estudos, foi observado que o gênero *Prevotella* estava associado com dietas com alta concentração de carboidratos e que está envolvido no processo de fermentação de carboidratos para produção de AGCC e AGCR (SUCHODOLSKI, 2011a; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; XU; KNIGHT, 2015).

Em relação ao filo Actinobacteria, os resultados encontrados estão de acordo com outros estudos que também apontaram baixa abundância para esse filo nas fezes de cães (MIDDELBOS et al., 2010; HANDL et al., 2011). No presente trabalho foi observado que o tratamento AC apresentou maior abundância desse filo do que o AM, e que o resultado encontrado para o grupo AC foi maior do que outros encontrados na literatura (HANDL et al., 2013; SANTOS et al., 2022). Middelbos et al. (2010) observaram diferença em cães para o filo Actinobacteria, sendo que o grupo que recebeu um alimento que continha 7,5% de polpa de beterraba em sua composição apresentou redução desse filo quando comparado com o grupo controle, que recebeu um alimento que não continha fibras fermentáveis. Handl et al. (2013) ao compararem a microbiota fecal de cães obesos e em ECC ideal, observaram que cães obesos tendem a apresentar maior concentração do filo Actinobacteria e da classe Gammaproteobacteria. No presente estudo, os animais do tratamento AC apresentaram maiores médias para estes filios e classe, entretanto, estavam em ECC ideal e como já demonstrado, não foi observada diferença para o ECC e PC quando comparado os dois tratamentos. Em estudo publicado recentemente por Macedo et al. (2022) foi observado aumento do filo Actinobacteria em cães após a perda de peso, portanto, são necessárias mais pesquisas para o melhor entendimento dessas diferenças encontradas entre os tratamentos AC e AM.

Dentre as 16 famílias identificadas neste estudo, nove (56,25%) pertenciam ao filo Firmicutes, uma (6,25%) ao filo Fusobacteria e duas (12,5%) para cada filo restante (Actinobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria), resultados semelhantes aos encontrados por Garcia-Mazcorro et al. (2012), no qual foi avaliada a microbiota fecal de seis cães saudáveis. Os autores também observaram abundância inferior a 1,0% para o gênero *Faecalibacterium*,

resultado diferente do observado no presente estudo, pois ambos os tratamentos resultaram em abundância superior a 1,0% e, o tratamento AM resultou em maior média do que o AC.

Handl et al. (2011) observaram que a classe de bactérias predominante nas fezes de cães saudáveis é a Clostridia, que é pertencente ao filo Firmicutes, este resultado também foi observado no presente estudo, e para esta classe o tratamento AM apresentou maior média que o AC. Handl et al. (2011) também observaram maiores médias de abundância do gênero *Clostridium* e *Ruminococcus*, integrantes da classe Clostridia, para estes gêneros as médias do tratamento AM também foram maiores (MIDDELBOS et al., 2010; BLAKE et al. 2016). Apesar do gênero *Clostridium* ser comumente associado a malefícios ao hospedeiro, como intoxicações e infecções, existem algumas espécies que podem trazer benefícios, como a produção de AGCC (VAN RIJSSEL; HANSEN, 1989).

Bactérias pertencentes ao *cluster Clostridium XIVa* são mais abundantes no intestino grosso de cães e, esse grupo é composto por vários gêneros dentro da família Lachnospiraceae (COLLINS et al., 1994). Esses microrganismos, por meio da fermentação, produzem AGCC e outros metabólitos que são benéficos para o epitélio intestinal e sistema imune do hospedeiro, que podem levar ao aumento da concentração de células T, por exemplo (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016). Algumas bactérias do gênero *Faecalibacterium* também podem produzir AGCC (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016). Além da produção de AGCC, as bactérias do *cluster XIVa* podem atuar na conversão dos ácidos biliares primários em secundários, que apresentam ação anti-inflamatória e reduzem a esporulação de algumas espécies bacterianas, como *Clostridium difficile*, que podem ocasionar inflamação no intestino grosso, caso ocorra aumento da sua população (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016).

No presente estudo, o tratamento AM resultou em maior abundância média do gênero *Faecalibacterium* e da família Lachnospiraceae. Além disso, também resultou em maiores abundâncias médias de três gêneros que compõem o *cluster Clostridium XIVa*, sendo eles: *L. Clostridium*, *L. Ruminococcus* e *Lachnospiraceae* (SUCHODOLSKI; CAMACHO; STEINER, 2008; SUCHODOLSKI, 2011b).

Bactérias responsáveis pela produção de ácido lático, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são microrganismos de interesse, pois assim como os carboidratos, o ácido lático também pode ser utilizado como substrato por alguns grupos bacterianos para produção de AGCC (HANDL et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2019). No presente estudo, foram identificadas bactérias tanto do gênero *Lactobacillus*, quanto do *Bifidobacterium*, entretanto, apenas nove animais após a ingestão do AC e três do AM apresentaram *Lactobacillus* nas fezes. O resultado encontrado para este gênero está de acordo com outros estudos, pois geralmente apenas nas amostras de alguns animais ele é identificado (GARCIA-MAZCORRO et al., 2012; SANTOS et al., 2022). Já em relação ao *Bifidobacterium*, foi observada maior abundância nas fezes dos cães que consumiram o AC. Novos estudos são necessários para se buscar o entendimento da redução destas bactérias lácticas nas fezes dos animais que consumiram o AM e, a sua possível relação com o aumento de outros grupos bacterianos também observados no presente trabalho.

Apesar do tratamento AM apresentar maiores médias para bactérias produtoras de AGCC e o tratamento AC para produtoras de lactato, não foi observada diferença para estas variáveis nas fezes. O tempo de adaptação aos alimentos é um fator que deve ser levado em consideração para analisar estas variáveis, pois é necessário coletar amostras após o período necessário para que o alimento module o microbioma do intestino grosso e com isso altere a concentração dos produtos de fermentação. No presente estudo optou-se por utilizar 29 dias de adaptação aos alimentos, tempo similar ao que outros autores empregaram (THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020) e, 60 dias de *washout*, tempo maior que o usual, para garantir que um tratamento não interferisse no outro. Em um estudo realizado por Perini et al. (2020) com cães saudáveis e quatro tratamentos (controle; 0,38% de galactoligossacarídeos; 0,5% e 1,0% de um blend de prebióticos), foi observado que um período de 30 ou 60 dias de ingestão dos alimentos com os prebióticos não alterou a maioria das variáveis de saúde intestinal analisadas.

Os AGCC são produtos de fermentação que com o aumento da sua produção ocasionam na redução do pH (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016). No presente estudo, era esperado encontrar diferença para estas variáveis, por conta do aumento da abundância relativa dos grupos bacterianos pertencentes

ao *cluster Clostridium XIVa* e ao gênero *Faecalibacterium*, porém, isto não ocorreu. Uma possível justificativa para estes resultados é a rápida absorção destes produtos pelos colonócitos, pois os AGCC atuam como fonte energética para estas células (SWANSON et al., 2002a; ZENTEK; MARQUART; PIETRZAK, 2002; PAWAR et al., 2017; LIN et al., 2019; RENTAS et al., 2020). Por conta dessa rápida absorção, o pH fecal e do intestino grosso podem diferir, como já foi observado em ratos e em cães, ou seja, no intestino grosso ocorre a redução do pH por conta do aumento da produção de AGCC, mas estas diferenças podem não ser identificadas nas fezes (VON ENGELHARDT et al., 1989; CAMPBELL; FAHEY; WOLF, 1997; SWANSON et al., 2002a). Outros estudos que avaliaram a oferta de diferentes promotores intestinais em cães, também não encontraram diferença de pH fecal e concentração de AGCC entre os tratamentos (SWANSON et al., 2002a; STERCOVA et al., 2016; THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Por outro lado, alguns autores já relataram aumento na concentração de pelo menos um AGCC após a ingestão de alguns tipos de prebióticos. Theodoro et al. (2019) ao analisarem o fornecimento de parede celular de levedura para cães saudáveis, observaram aumento na concentração de butirato nas fezes do grupo que ingeriu parede celular de levedura com 20% de manonoligossacarídeos, nesse estudo foram utilizados 23 a 25 dias de adaptação aos alimentos (INAN et al., 2000; YIN; LAEVSKY; GIARDINA, 2001; RIVIÈRE et al., 2016; CHUNG et al., 2017; HOLSCHER, 2017; JIMINEZ et al., 2017).

Para o ácido lático ou lactato também era esperado encontrar diferença devido ao aumento da abundância de bactérias que produzem este metabólito no tratamento AC, entretanto, este resultado também não foi observado. Uma possível justificativa, é devido a rápida utilização deste metabólito por alguns grupos bacterianos para a produção de AGCC (MOENS et al., 2019). Bactérias benéficas o utilizam para a síntese do ácido acético e como precursor do ácido butírico (LOUIS et al., 2007; MOENS et al., 2019). Em alguns estudos realizados com diferentes prebióticos também não foi observada diferença para esta variável, quando analisada nas fezes (SWANSON et al., 2002a; STERCOVA et al., 2016; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022).

Kröger et al. (2017) ao avaliarem o fornecimento de três alimentos experimentais (2,7% de polpa de beterraba; 2,7% de lignocelulose e 12,0% de

polpa de beterraba), observaram concentrações médias maiores de acetato, propionato, butirato, ácidos graxos totais e lactato nas fezes dos animais que receberam o alimento que continha 12,0% de polpa de beterraba, além de redução do pH fecal nos dois grupos que consumiram os alimentos que continham polpa de beterraba, quando comparado ao que consumiu lignocelulose. O que indica, que possivelmente, para encontrar diferença nestas variáveis nas fezes é necessária grande inclusão de fibras fermentáveis ou aditivos prebióticos.

A amônia e os AGCR são considerados produtos putrefativos e, são produzidos por bactérias proteolíticas a partir da fermentação de proteínas (MINER; HAZEN., 1969; NERY et al., 2012). No presente estudo, não foi observada diferença entre os tratamentos nos resultados destes produtos putrefativos. Sabe-se que a amônia é um composto tóxico e quando é absorvida em altas concentrações pode ocasionar alterações sistêmicas em cães e apresentar potencial cancerígeno, além de poder causar alterações em mucosas e reduzir a altura dos vilos intestinais e, assim, alterar a absorção dos nutrientes (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001; BLACHIER et al., 2007).

Um dos objetivos da adição de aditivos, como os prebióticos, na alimentação de cães, é promover saúde aos animais, além de modular os microrganismos do intestino grosso e, por consequência, os produtos de fermentação (THEODORO et al., 2019; RENTAS et al., 2020). Alguns estudos têm demonstrado que diferentes prebióticos podem alterar a imunidade de cães, devido a sua capacidade de modular o microbioma intestinal (SWANSON et al., 2002a; PAWAR et al., 2017; RENTAS et al., 2020; SANTOS et al., 2022). No presente estudo, esse resultado esperado para este tipo de aditivo foi observado no grupo que recebeu extrato de malte.

Para a análise de proliferação de linfócitos foi utilizado a FHA, que é uma lectina estimulante de células T (TIZARD, 2009). Este mitógeno, assim como a concanavalina A, tem sido utilizado em diversos estudos com imunidade e tem demonstrado melhores resultados quando comparado com outros mitógenos e antígenos (THILSTED; SHIFRINE, 1977; VAN DE VELDE et al., 2013; KRÖGER; HEIDE; ZENTEK, 2020; KROLL et al., 2020). As células T desempenham papel importante para regulação do sistema imune e de defesa contra patógenos invasores. A proliferação é essencial para a diferenciação, homeostase e

resposta imune dos linfócitos (MORTLOCK; WEI; WILLIAMSON, 2015). No presente estudo, para determinação dessa variável, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, um dos métodos atuais mais precisos para esse tipo de análise (LYONS, 2000; SATHIYASEELAN; BALDWIN, 2000).

Os resultados referentes ao índice e taxa de proliferação de linfócitos foram maiores para o tratamento AM, o que demonstra possível aumento na resposta de proliferação linfocitária frente a identificação pelo sistema imune de algum antígeno ou microrganismo invasor. Estes resultados podem estar relacionados com o aumento da abundância relativa dos grupos bacterianos que produzem AGCC, que também foram encontrados em maior concentração para o tratamento AM, pois como relatado por outros autores, uma das formas de estímulo do sistema imune pelos AGCC é através do aumento da população de células T (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016).

Em um estudo realizado por Kroll et al. (2020) com cães adultos e geriátricos que foram divididos em seis grupos, sendo três para cães adultos e três para geriátricos, foi observado que antes de receberem os alimentos experimentais, os animais adultos apresentavam taxa de proliferação de linfócitos de 25 a 40% e, após receberem os alimentos experimentais (controle; 400mg/kg e 800mg/kg de mananoproteínas derivadas de parede celular de levedura), houve aumento (35 a 45%). Os valores encontrados no estudo realizado por Kroll et al. (2020) antes da ingestão dos alimentos, são parecidos com os do presente estudo (26,85% a 29,84%), porém, os resultados após a ingestão dos alimentos são superiores. Vendramini et al. (2020) ao avaliarem a taxa de proliferação de linfócitos em cães com ECC ideal e emagrecidos encontraram porcentagens de 17,25% e 18,48%, respectivamente, resultados inferiores aos que foram encontrados nos dois grupos (AM e AC) do presente estudo. Diante do exposto, pode-se observar que há variação nos resultados de taxa de proliferação para cães saudáveis e que ainda não foram determinados valores de referência para esta variável, sendo mais relevante levar em consideração os dados obtidos em cada estudo, para analisar possíveis efeitos benéficos de aditivos adicionados aos alimentos com o intuito de promover melhora na imunidade.

Em relação ao índice de proliferação de linfócitos, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com outros dados da literatura

para cães saudáveis. Em estudo realizado por Bruin et al. (2007) foi observado que esse índice para cães saudáveis se manteve entre 0,5 e 4,8 ao longo de 24 meses, o que também demonstra variação nesses resultados com o tempo. Em outro estudo realizado por Alarça et al. (2016) com cães adultos saudáveis e dois alimentos experimentais, um controle e outro que continha 45g/kg de xantofila (luteína), foram observados valores de índice de proliferação de 1,56 para o grupo controle e 1,69 para o grupo que recebeu o alimento com xantofila, sendo estes inferiores aos que foram encontrados no presente estudo.

A relação $CD4^+ : CD8^+$ encontrada no presente estudo foi similar à de algumas pesquisas publicadas, como de Chew et al. (2000). As células $CD4^+$ e $CD8^+$ são linfócitos T que possuem função de células T *helper* e T citotóxicas, respectivamente. Logo, é importante que diante de um organismo invasor a concentração de células T $CD8^+$ circulante aumente e, após o controle dos patógenos, diminua (HELLWEG et al., 2008). Esse aumento não pode ter longa duração, pois pode resultar em problemas como respostas inflamatórias graves (DAY, 2010).

Em estudo realizado por Chew et al. (2000), foi observada diferença entre tratamentos para os valores de relação $CD4^+ : CD8^+$, para o grupo que recebeu um alimento que continha em sua composição 50mg de β -caroteno o valor da relação foi de 1,21 e para o grupo controle, que recebeu um alimento que não continha β -caroteno, de 0,85. Os autores concluíram que o β -caroteno melhorou a resposta imune dos cães que participaram do estudo. Entretanto, outros trabalhos encontraram valores superiores para relação $CD4^+ : CD8^+$ quando comparado com o observado no presente estudo. Kröger et al. (2020) apontaram relação de 2,42 e 2,58 em cães saudáveis após o consumo de um alimento que continha em sua composição carne de cordeiro e outro com farinha de insetos, respectivamente. Blount et al. (2005) encontraram valores parecidos de relação $CD4^+ : CD8^+$ em labradores saudáveis com idade similar a dos cães avaliados no presente estudo. Cães com idade média de 1,96 anos apresentaram valor de 2,67 e, cães com idade média de 3,96 anos foi observada relação de 2,22. Todavia, os autores não relataram se os animais consumiram o mesmo alimento. Em outro estudo realizado por HogenEsch et al. (2004) foi observado que cães jovens (idade média de 3,15 anos) apresentaram relação média dos linfócitos $CD4^+ : CD8^+$ de 3,0; enquanto cães geriátricos (idade média de 12,1 anos)

apresentaram relação de 1,8. Como para este tipo de análise também não é encontrado valor de referência para cães saudáveis, torna-se mais relevante levar em consideração os dados obtidos em cada estudo, para avaliar os efeitos imunomoduladores da adição de algum aditivo na alimentação destes animais.

A porcentagem de células CD4⁺ observada no presente estudo foi menor do que outras publicadas na literatura com cães saudáveis (30,10% a 46,92%), já a porcentagem de células CD8⁺ está de acordo com a de outros trabalhos (18,87% a 20,02%) (CHEW et al., 2000; BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005; KRÖGER; HEIDE; ZENTEK, 2020). Apesar da técnica de citometria de fluxo ser usada com frequência em estudos com imunologia para se obter as porcentagens relativas das subpopulações de linfócitos, como as células T CD4⁺ e CD8⁺, é necessário ter cuidado com as interpretações desses resultados. Por exemplo, no presente estudo foi observada menor porcentagem de células T CD4⁺ quando comparado com outros trabalhos. Ao se analisar estes dados, pode-se pensar que a população absoluta de células T CD4⁺ também apresentou redução. Embora isso realmente possa ter acontecido, também pode ter ocorrido da população absoluta de células T CD4⁺ ter sido parecida com valores observados em outros estudos, porém a porcentagem encontrada no presente estudo ter sido menor, devido a população absoluta das células T CD8⁺ ter aumentado quando comparado com outros dados publicados na literatura (BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005). Logo, seria importante se obter e analisar os dados de população absoluta destas células para um resultado mais concreto, entretanto, no presente estudo, isso não foi possível, por conta da pandemia de Covid-19, que dificultou a compra dos *primers* para realização desta parte da análise.

8. CONCLUSÕES

A inclusão do extrato de malte a 1% sobre a cobertura de alimento seco extrusado para cães, não alterou o aproveitamento de nutrientes, os produtos fermentativos fecais, a produção fecal, o escore fecal, entretanto, modulou a microbiota fecal, aumentando a abundância de bactérias do *cluster Clostridium XIVa* e do gênero *Faecalibacterium*, além de apresentar uma possível capacidade imunomoduladora sobre variáveis linfocitárias.

7. REFERÊNCIAS

- AAFCO. **Association of American Feed Control Officials**. Washington, DC: Official Publication, 2019.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology: Functions and disorders of the immune system**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2019.
- ABINPET. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação - Mercado Pet Brasil 2018**. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/mercado/>>. Acesso em: 1 jan. 2021.
- ABOOD, S. K.; VERTON-SHAW, S. Talking About Dog and Cat Nutrition with Clients. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 51, p. 517–528, 2021.
- AHMAD, A. et al. Physicochemical and functional properties of barley b-glucan as affected by different extraction procedures. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 181–187, 2009.
- AHMAD, A. et al. Beta glucan: A valuable functional ingredient in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 201–212, 2012.
- ALARÇA, L. G. et al. Dietary lutein supplementation on diet digestibility and blood parameters of dogs. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2195–2201, 2016.
- ALY, M. E. Malt extract for enhancing flavour development of ultrafiltered Domiati cheese. **Food Chemistry**, v. 59, p. 127–133, 1997.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis**. 16. ed. [s.l.: s.n.]
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, EUA: AOAC Internacional, 2006.
- ARIF, M. et al. Effect of soaking and malting on the selected nutrient profile of barley. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research**, v. 44, n. 1, p. 18–21, 2011.
- BAIK, B. K.; ULLRICH, S. E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 233–242, 2008.
- BAMFORTH, C. W. Biochemical approaches to beer quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 154–160, 1985.
- BEAL, A. D.; MOTTRAM, D. S. An evaluation of the aroma characteristics of malted barley by free-choice profiling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, p. 17–22, 1993.

BEER, M. U. et al. Effect of cooking and storage on the amount and molecular weight of (1→3)(1→4)- β -D-glucan extracted from oat products by an in vitro digestion system. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 705–709, 1997.

BEGEA, M. et al. Pilot Technology to Obtain a Bio-based Product from Barley Malt Rootlets. **International Journal of Food and Biosystems Engineering**, v. 3, n. 1, p. 66–72, 2017.

BELOSHAPKA, A. N. et al. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, p. 532–541, 2013.

BELOSHAPKA, A. N. et al. Compositional analysis of whole grains, processed grains, grain co-products, and other carbohydrate sources with applicability to pet animal nutrition. **Foods**, v. 5, n. 2, p. 23, 2016.

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.

BENDER, D. A. **Bender's dictionary of nutrition and food technology**. 8. ed. Sawston: Woodhead Publishing Limited, 2006.

BETTENHAUSEN, H. M. et al. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, p. 487–504, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.024>>.

BIÖRKLUND, M. et al. Changes in serum lipids and postprandial glucose and insulin concentrations after consumption of beverages with β -glucans from oats or barley: A randomised dose-controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 1272–1281, 2005.

BLACHIER, F. et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 547–562, 2007.

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

BLOUNT, D. G.; PRITCHARD, D. I.; HEATON, P. R. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 3–4, p. 399–407, 2005.

BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene

amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 90, 2018.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 2019.

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, p. 325–349, 1957.

BRIGGS, D. E. Barley for animal and human food. In: **Barley**. [s.l: s.n.]p. 492–525.

BRIGGS, D. E. **Malts and Malting**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1998.

BRUNO, G. et al. The Revival of an "Old" Marker: CD4/CD8 Ratio. **AIDS reviews**, v. 19, n. 2, p. 81–88, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182620>>.

BUCHANAN, R. L. et al. Pet food safety: a shared concern. **The British journal of nutrition**, v. 106, p. S78–S84, 2011.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 1, p. 130–136, 1997.

CARVALHO, D. O.; GONÇALVES, L. M.; GUIDO, L. F. Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 927–943, 2016.

CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 203–211, 2006.

CHANDRA, G. S.; PROUDLOVE, M. O.; BAXTER, E. D. The structure of barley endosperm - An important determinant of malt modification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 1, p. 37–46, 1999.

CHEW, B. P. et al. Dietary B-carotene stimulates cell-mediated and humoral immune response in dogs. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients Research Communication**, v. 130, n. 8, p. 1910–1913, 2000.

CHUNG, W. S. F. et al. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides

to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 2017.

COLLINS, H. M. et al. Mapping and validation of chromosome regions associated with high malt extract in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, p. 1223–1240, 2003.

COLLINS, M. D. et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 812–826, 1994.

COMPÊNDIO. Guia de métodos analíticos. In: **COMPÊNDIO Brasileiro de Alimentação Animal 2017**. São Paulo, Brasil: SINDIRAÇÕES, 2017.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: Short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 12, p. 499–507, 1998.

DAOU, C.; ZHANG, H. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 355–365, 2012.

DAY, M. J. Ageing, Immunosenescence and Inflammageing in the Dog and Cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 1, p. S60–S69, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.011>>.

DE BRITO, C. B. M. et al. Effect of dietary inclusion of dried apple pomace on faecal butyrate concentration and modulation of gut microbiota in dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 75, n. 1, p. 48–63, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1745039X.2020.1867463>>.

DE BRUIN, T. et al. Lymphocyte proliferation to collagen type I in dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 54, p. 292–296, 2007.

DELANEY, S. J. Management of Anorexia in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 36, p. 1243–1249, 2006.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Future aspects and perceptions of companion animal nutrition and sustainability. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 823–834, 2015.

DI CERBO, A. et al. Functional foods in pet nutrition: Focus on dogs and cats. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 161–166, 2017.

- DUKE, S. H.; HENSON, C. A. A comparison of barley malt quality measurements and malt sugar concentrations. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 3, p. 151–161, 2008.
- FAITH, D. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological Conservation**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 1992.
- FAO. **Food and Agriculture Organization: FAOSTAT - Barley**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- FEDIAF. **FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. Bruxelas, BE: The European Pet Food Industry Federation, 2020.
- FERREIRA, E. M. et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 30–39, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.007>>.
- FERREIRA, L. G. et al. Oat beta-glucan as a dietary supplement for dogs. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0201133, 2018.
- FERRELL, F. Preference for sugars and nonnutritive sweeteners in young beagles. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 8, p. 199–203, 1984.
- FINCHER, G. B. Morphology and chemical composition of barley endosperm cell walls. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 81, p. 116–122, 1975.
- FLICKINGER, E. A. et al. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2008–2018, 2003.
- GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **MicrobiologyOpen**, v. 1, p. 340–347, 2012.
- GIBSON, G. R. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 491–502, 2017.
- GOMES, M. O. S. **Efeito da adição de parece celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal/SP, 2009.
- GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. B-glucan recognition by

the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 230, p. 38–50, 2009.

GOUPY, P. et al. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1625–1634, 1999.

GRIFFIN, R. Palatability testing methods: parameters and analyses that influence test conditions. In: **Petfood Technology**. 1 ed. ed. Mount Morris: Watt Publishing Company, 2003. p. 187–193.

GUPTA, M.; ABU-GHANNAM, N.; GALLAGHAR, E. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 318–328, 2010.

GUPTA, R. C. et al. Nutraceuticals in animal health and diseases. In: **Nutraceuticals**. [s.l.] INC, 2021. p. 1127–1141.

HANDL, S. et al. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 301–310, 2011.

HANDL, S. et al. Faecal microbiota in lean and obese dogs. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 84, p. 332–343, 2013.

HELLWEG, P. et al. Effects of bovine lactoferrin on the immune system and the intestinal microflora of adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 152–161, 2008.

HENRY, R. J. Changes in β -glucan and other carbohydrate components of barley during malting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 42, p. 333–341, 1988.

HOGENESCH, H. et al. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: A cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 77–85, 2004.

HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 172–184, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>>.

HUDSON, O. P. Malting Technology. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92,

p. 115–122, 1986.

IBGE. Presença de animais no domicílio. In: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Pesquisa Nacional de Saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. p. 26–27.

INAN, M. S. et al. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- κ B activity in a human colonic epithelial cell line. **Gastroenterology**, v. 118, p. 724–734, 2000.

IPB. **Instituto Pet Brasil - Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil**. Disponível em: <<http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>>. Acesso em: 1 jan. 2021.

JACKSON, S. W.; HUDSON, J. R. Flavour From Crystal Malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 84, p. 34–40, 1978.

JADHAV, S. J. et al. Barley : Chemistry and Value-Added Processing. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 2, p. 123–171, 1998.

JIMINEZ, J. A. et al. Butyrate Supplementation at High Concentrations Alters Enteric Bacterial Communities and Reduces Intestinal Inflammation in Mice Infected with *Citrobacter rodentium*. **American Society for Microbiology**, v. 2, n. 4, p. e00243-17, 2017.

JOHANSSON, L. et al. Comparison of the solution properties of (1→3),(1→4)- β -d-glucans extracted from oats and barley. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 180–184, 2008.

JOHNSON, L. N.; FREEMAN, L. M. Recognizing, describing, and managing reduced food intake in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 11, p. 1260–1266, 2017.

KATOH, K. et al. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

KNIGHT, R. et al. The Microbiome and Human Biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 18, p. 65–86, 2017.

KORE, K. B. et al. Evaluation of mannanoligosaccharide as prebiotic functional food for dogs: Effect on nutrient digestibility, hind gut health and plasma metabolic profile. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 82, n. 1, p. 81–86, 2012.

KRÖGER, S.; HEIDE, C.; ZENTEK, J. Evaluation of an extruded diet for adult

- dogs containing larvae meal from the Black soldier fly (*Hermetia illucens*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, p. 114699, 2020.
- KRÖGER, S.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Influence of lignocellulose and low or high levels of sugar beet pulp on nutrient digestibility and the fecal microbiota in dogs. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 1598–1605, 2017.
- KROLL, F. S. A. et al. Active fractions of mannoproteins derived from yeast cell wall stimulate innate and acquired immunity of adult and elderly dogs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 261, p. 114392, 2020.
- KUDRENKO, B.; SNAPE, N.; BARNES, A. C. Linear and branched $\beta(1-3)$ -D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: Implications for dietary immunostimulation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 443–450, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.01.009>>.
- KULICKE, W. M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. **Carbohydrate Research**, v. 297, p. 135–143, 1997.
- LAFLAMME, D. P. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. **Canine Practice**, v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.
- LAZARIDOU, A. et al. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) linear β -D-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 837–855, 2004.
- LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. **Journal of Cereal Science**, v. 46, p. 101–118, 2007.
- LI, Q. et al. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. **mBio**, v. 8, n. 1, 2017.
- LIN, C.-Y. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. **Journal of animal science**, v. 97, n. 4, p. 1586–1599, 2019. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L627221541%0Ahttp://dx.doi.org/10.1093/jas/skz064>>.
- LOUIS, P. et al. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1197–1208,

2007.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1576–1585, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

LUSK, L. T. et al. Barley β -glucan and beer foam stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n. 4, p. 183–186, 2001.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 147–154, 2000.

MACEDO, H. T. et al. Weight-loss in obese dogs promotes important shifts in fecal microbiota profile to the extent of resembling microbiota of lean dogs. **Animal Microbiome**, v. 4, p. 6, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s42523-021-00160-x>>.

MAILLARD, M. N. et al. Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, p. 238–244, 1996.

MARTÍNEZ, M. et al. Phytochemical composition and β -glucan content of barley genotypes from two different geographic origins for human health food production. **Food Chemistry**, v. 245, p. 61–70, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.026>>.

MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 6, p. 610–618, 2012.

MEINTS, B.; HAYES, P. M. Breeding Naked Barley for Food, Feed, and Malt. In: GOLDMAN, I. (Ed.). **Plant Breeding Reviews**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2020. 43p. 95–119.

MICHEL, K. E. et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy X-ray absorptiometry. **The British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 57–59, 2011.

MIDDELBOS, I. S. et al. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility,

immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 11, p. 3022–3032, 2007.

MIDDELBOS, I. S. et al. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9768, 2010.

MINER, J. R.; HAZEN., T. E. Ammonia and amines: components of swine building odor. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 12, p. 772–774, 1969.

MITROULIS, I. et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. **Cell**, v. 172, p. 147–161, 2018.

MOENS, F. et al. A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.020>>.

MORGAN, A. G. .; GILL, A. A. .; SMITH, D. B. Some barley grain and green malt properties and their influence on malt hot-water extract: I. β -glucan, β -glucan solubilase and endo- β -glucanase. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 89, p. 283–291, 1983.

MORTLOCK, S. A.; WEI, J.; WILLIAMSON, P. T-cell activation and early gene response in dogs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121169, 2015.

NERY, J. et al. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2570–2580, 2012.

NEWMAN, R. K.; NEWMAN, C. W. **Barley for food and health: Science, technology, and products**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2008.

NEWTON, A. C. et al. Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. **Food Security**, v. 3, p. 141–178, 2011.

NOGUEIRA, J. P. de S. et al. Dietary supplementation of a fiber-prebiotic and saccharin-eugenol blend in extruded diets fed to dogs. **Journal of Animal Science**, v. 97, p. 4519–4531, 2019.

NRC. **NRC - National Research Council. Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. Washington, DC: National Academies Press, 2006.

- OMWAMBA, M.; HU, Q. Antioxidant capacity and antioxidative compounds in barley (*hordeum vulgare* L.) grain optimized using response surface methodology in hot air roasting. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 907–914, 2009.
- ÖZCAN, M. M.; ALJUHAIMI, F.; USLU, N. Effect of malt process steps on bioactive properties and fatty acid composition of barley, green malt and malt grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 226–232, 2018.
- PAIK, J.; LOW, N. H.; INGLEDEW, W. M. Malt Extract: Relationship of Chemical Composition to Fermentability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 49, n. 1, p. 8–13, 1991.
- PANASEVICH, M. R. et al. Modulation of the faecal microbiome of healthy adult dogs by inclusion of potato fibre in the diet. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 125–133, 2015.
- PARIS, S. et al. β -Glucan-Induced Trained Immunity in Dogs. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 566893, 2020a.
- PARIS, S. et al. β -Glucan as Trained Immunity-Based Adjuvants for Rabies Vaccines in Dogs. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 564497, 2020b.
- PARR, H.; BOLAT, I.; COOK, D. Modelling flavour formation in roasted malt substrates under controlled conditions of time and temperature. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127641, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127641>>.
- PAWAR, M. M. et al. Effect of dietary mannanoligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, hindgut fermentation, immune response and antioxidant indices in dogs. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 59, p. 11, 2017.
- PERINI, M. P. et al. Duration of prebiotic intake is a key-factor for diet-induced modulation of immunity and fecal fermentation products in dogs. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1916, 2020.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.
- PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p. 1121–1151, 1969.
- QURESHI, A. A. et al. The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 23, p. 10544–

10550, 1986.

REDFERN, A.; SUCHODOLSKI, J.; JERGENS, A. Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. **Veterinary Record**, v. 181, p. 370, 2017.

REICHEL, S. et al. Profiling the volatile carbonyl compounds of barley and malt samples using a low-pressure assisted extraction system. **Food Control**, v. 121, p. 107568, 2021.

RENTAS, M. F. et al. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0238006, 2020.

RIMSTEN, L. et al. Effects of malting on β -glucanase and phytase activity in barley grain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 904–912, 2002.

RIMSTEN, L. et al. Determination of α -glucan molecular weight using SEC with calcofluor detection in cereal extracts. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 485–490, 2003.

RIVIÈRE, A. et al. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 979, 2016.

SANTOS, K. de M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* dehydrated culture modulates fecal microbiota and improves innate immunity of adult dogs. **Fermentation**, v. 8, n. 1, p. 2, 2022.

SATHIYASEELAN, T.; BALDWIN, C. L. Evaluation of cell replication by bovine T cells in polyclonally activated cultures using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) loading and flow cytometric analysis. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 275–281, 2000.

ŠIMIĆ, G. et al. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of malting and hullless barley grain and malt extracts. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 35, n. 1, p. 73–78, 2017.

ŠIMIĆ, G. et al. Distribution of β -glucan, phenolic acids, and proteins as functional phytonutrients of hull-less barley grain. **Foods**, v. 8, n. 12, p. 680, 2019.

SKENDI, A.; PAPAGEORGIU, M. millenium. **Millenium**, v. 2, n. 7, p. 49–58, 2018.

STERCOVA, E. et al. Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient

digestibility and fecal microflora in beagle dogs. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 2909–2918, 2016.

STRICKLING, J. A. et al. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: Influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, p. 205–219, 2000.

STUYVEN, E. et al. Oral administration of β -1,3/1,6-glucan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 281–285, 2010.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 261–272, 2011a.

SUCHODOLSKI, J. S. Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1520–1530, 2011b.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51907, 2012.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO, J.; STEINER, J. M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 66, p. 567–578, 2008.

SWANSON, K. S. et al. 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, n. 5, p. 980–989, 2002a.

SWANSON, K. S. et al. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3721–3731, 2002b.

SWANSON, K. S. et al. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 56, p. 309–318, 2002c.

TEIXEIRA, C. et al. Effects of variety and steeping conditions on some barley components associated with colonic health. **Journal of the Science of Food**

and Agriculture, v. 96, p. 4821–4827, 2016.

THEODORO, S. de S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0225659, 2019.

THILSTED, J. P.; SHIFRINE, M. Lymphocyte transformation in the dog: response of lymphocytes from normal and immune dogs to phytohemagglutinin, concanavalin, and purified-protein derivative. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 1, p. 81–87, 1977.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 8th. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2009.

TONIAZZO, C. et al. Malting quality and genetic diversity in Brazilian elite barley germplasm. **International Journal of Current Research**, v. 9, n. 6, p. 52352–52357, 2017.

TOSH, S. M.; BORDENAVE, N. Emerging science on benefits of whole grain oat and barley and their soluble dietary fibers for heart health, glycemic response, and gut microbiota. **Nutrition Reviews**, v. 78, n. S1, p. 13–20, 2020.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242–249, 2012.

TURNBAUGH, P. J. et al. The Human Microbiome Project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 2007.

ULLRICH, S. E. et al. B-Glucan Content and Viscosity of Extracts From Waxy Barley. **Journal of Cereal Science**, v. 4, p. 279–285, 1986.

ULMIUS, M. et al. Gastrointestinal conditions influence the solution behaviour of cereal β -glucans in vitro. **Food Chemistry**, v. 130, p. 536–540, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.066>>.

VAN DE VELDE, H. et al. Proliferation capacity of T-lymphocytes is affected transiently after a long-term weight gain in Beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 237–244, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.011>>.

VAN RIJSSEL, M.; HANSEN, T. A. Fermentation of pectin by a newly isolated *Clostridium thermosaccharolyticum* strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 61, p. 41–46, 1989.

VAN ROOIJEN, C. et al. The Maillard reaction and pet food processing: Effects on nutritive value and pet health. **Nutrition Research Reviews**, v. 26, n. 2, p.

130–148, 2013.

VANDERHAEGEN, B. et al. The chemistry of beer aging - A critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357–381, 2006.

VENDRAMINI, T. H. A. et al. Gene expression of the immunoinflammatory and immunological status of obese dogs before and after weight loss. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238638, 2020.

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. 1980. Universidade Federal de Viçosa, 1980.

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

VON ENGELHARDT, W. et al. Absorption of short-chain fatty acids and their role in the hindgut of monogastric animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 23, p. 43–53, 1989.

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.

WALTHAM. **The WALTHAM™ Faeces Scoring System**. [s.l.: s.n.].

WERNIMONT, S. M. et al. The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1266, 2020.

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, n. 2, p. 207–228, 2001.

WILLIAMS, D. L.; MUELLER, A.; BROWDER, W. Gluean-Based Macrophage Stimulators - A Review of their Anti-Infective Potential. **Clin. Immunother**, v. 5, n. 5, p. 392–399, 1996.

XU, Z.; KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **The British journal of nutrition**, v. 113, p. S1–S5, 2015.

YAHYA, H.; LINFORTH, R. S. T.; COOK, D. J. Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. **Food Chemistry**, v. 145, p. 378–387, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.046>>.

YIN, L.; LAEVSKY, G.; GIARDINA, C. Butyrate Suppression of Colonocyte NF- κ B Activation and Cellular Proteasome Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 44641–44646, 2001. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105170200>>.

ZENEWICZ, L. A.; ANTOV, A.; FLAVELL, R. A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 199–207, 2009.

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

ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of mashing on total phenolic contents and antioxidant activities of malts and worts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 240–247, 2012.