RAPHAELLA ARANTES PEREIRA

Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos

Pirassununga

2022

RAPHAELLA ARANTES PEREIRA

Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal (VNP)

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso

VERSÃO CORRIGIDA

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

T. 4201
FMVZ

Pereira, Raphaella Arantes
Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos / Raphaella Arantes Pereira – 2022.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

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

1. Cavalos. 2. Fermentação. 3. Microbiota. 4. Saúde digestiva. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.

Certificado da Comissão de Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 12 de maio de 2022
CEUA N 5848180220
(ID 009068)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alexandre Augusto De Oliveira Gobesso
Área: Nutrição E Produção Animal

Título da proposta: "Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos ".

CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 09/maio/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 09/maio/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicita-se a alteração do título aprovado inicialmente desta proposta. Além disso, solicita-se a alteração do responsável da proposta de: Djanira Paula Soares de Souza Silva para Raphaella Arantes Pereira, sob orientação do prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso. Esta última também será solicitada via emenda. ".

Comentário da CEUA: Título alterado conforme solicitado. A inclusão do nome da aluna deve ser via emenda.

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

São Paulo, 12 de maio de 2022
CEUA N 5848180220
(ID 009069)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alexandre Augusto De Oliveira Gobesso
Área: Nutrição E Produção Animal

Título da proposta: "Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos ".

CERTIFICADO (Emenda versão de 09/maio/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 09/maio/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicita-se a altera??o do pesquisador respons?vel de: Djanira Paula Soares de Souza Silva para Raphaella Arantes Pereira, sob orienta??o do Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso. ".

Pesquisador adicionado:

Nome:	Raphaella Arantes Pereira		
Instituição:	Universidade de São Paulo - FMVZ	Nível:	Graduado
Vínculo:	Aluno de pós-graduação		
Experiência:	Sim: 3 (ano)	Treinamento:	Sim: 480 (hora)
Cv. Lattes:	http://lattes.cnpq.br/4477855733979361		
Setor:	Nutrição e Produção Animal - VNP	Função:	Pós-Graduando

Comentário da CEUA: Raphaella Arantes Pereira adicionada como pesquisadora à proposta.

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEREIRA, Raphaella Arantes

Título: Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos.

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:_____

À Aline, Wilton e Philliipe, que foram meu porto seguro. À Joanna Sisterolli e Ana Carolina Boscoli, os meus anjos da guarda. E aos cavalos, os maiores incentivadores do meu sonho de criança. Dedico esta obra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às forças espirituais. Oxalá, Esù e Osún, que me permitiram a vida e me indicaram os caminhos, me permitindo a escolha. Que me cuidaram e ensinaram a ser movimento e calmaria com o devido equilíbrio. Ao sacerdote “Pai Luiz” por ter me feito sentir em casa, como quando criança, e nos ensinar a ser, além de tudo, seres humanos.

Agradeço ao meu orientador Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, quem viabilizou o meu sonho e abriu as portas de um dos lugares mais incríveis contribuindo com todo o meu aprendizado técnico e, principalmente, desenvolvimento pessoal. O senhor me possibilitou vivências e oportunidades inimagináveis desde quando começamos a trilhar este caminho.

Aos meus colegas de pós-graduação Djanira Paula, Raquel Buroxid, Júlia Rizzo, Monique Duarte, Henrique, Ana Paula, André Cerbaro, Filipe Bastos, Alisson Herculano, Ângelo Mateus e Gabriela Pombo. “Entre tapas e beijos”, como qualquer desenvolvimento deve ser.

À Renata de Mello, Anna Catarina Vilarinho, alunos de iniciação científica e estagiários envolvidos neste processo, por todas as alegrias vividas entre as madrugadas no galpão do LabEqui e convivência diária.

À Maria Júlia Andrade, por um bilhete de mensagem simples, onde “se venda” mudou todo o meu caminho profissional e a forma com que me portei diante dos desafios, e Matheus Nogueira, um dos meus maiores incentivadores nos momentos mais desafiadores da minha carreira até aqui.

Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP e setor de Equideocultura.

À CP Kelco pelo financiamento e todo o engajamento destinado à execução, financiamento e colaboração com este experimento.

Ao Darius, Taleezze, Brittan, Malcon, Ramsey, Shawan (*in memorian*), Linguiça e Maximus, os atores principais e peças fundamentais para que todo este trabalho fosse realizado.

Às amizades que serão levadas por toda a minha vida. Djanira Paula, Júlia Rizzo, Raquel Buroxid, Kálita Michelle, Maria Fernanda e Iara Catunda. Que eu possa retribuir toda a amizade e consideração que tiveram por mim. Que eu possa retribuir

o tempo despendido por vocês voltado para o meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

À Cleide Lemes, Nathália Lemes e Eduarda Lemes por terem se tornado família e permitido que nos tornássemos também. À Cláudia Palmezano e Natália Palmezano que estiveram presentes por toda essa caminhada. Ao Sidney Gabriel, que sempre cuidou e esteve ao lado da minha base, além de suportar conosco toda a caminhada.

À Ana Carolina Boscoli (*in memorian*), hoje mais do que nunca por ter sido a minha base. Você foi determinante na minha carreira. Que eu possa retribuir todo o seu amor por mim em forma de amor e respeito aos cavalos, assim como você fazia. Seu nome será lembrado para sempre.

Ao meu pai Wilton, por todos os conselhos dados, por todo o trabalho mental e paciência que teve em todos os momentos em que eu não pude ter. À minha mãe Aline, por ser o meu caminho de volta para a segurança emocional e psicológica, mesmo quando eu achei que você não soubesse o que estava acontecendo, e você pressentia. Ao meu irmão Phillipe, por ser o meu caminho todas as vezes em que me perdi, o meu braço forte. Vocês foram o meu incentivo. Joanna Sisterolli (*in memorian*), em minhas últimas lembranças, aos 6 anos de idade que me deixou algo como: “A única coisa que ninguém te tira na vida é o conhecimento. Estude.”.

RESUMO

PEREIRA, R. A. **Efeito da suplementação com pectina na dieta de equinos.** 2022, 113 FOLHAS. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Este estudo objetiva avaliar a adição de diferentes teores de pectina na dieta de equinos submetidos à alta inclusão de amido. Foram utilizados oito equinos machos, castrados, da raça Puro Sangue Árabe, de peso médio de 439,75kg ± 34,89kg e 12 anos de idade. Foram fornecidos 1,75% do peso corpóreo (PC) em matéria seca, em duas refeições diárias, com água e sal mineral *ad libitum*. O delineamento experimental foi o quadrado latino duplo 4×4 contemporâneo, com as quatro dietas avaliadas em quatro períodos de 22 dias cada. Para tal, 15 dias foram destinados à adaptação a dieta, 5 dias para a coleta total de fezes (CTF) e 2 dias para a coleta de conteúdo estomacal. Estes períodos foram intercalados por 15 dias de *wash out*. Dieta basal de referência (DB) obedeceu a relação 40% volumoso *Cynodon spp.* e 60% ração concentrada com alto teor de amido (4,3 $g.Kg^{-1}$ de PC por dia). A superfibra utilizada resultou em 39,3% de pectina na matéria seca. Os grupos de tratamentos foram: CON) DB sem adição de superfibra; 2) DB + 120 $g.dia^{-1}$ de superfibra; 3) DB + 240$g.dia^{-1}$ de superfibra; 4) DB + 360$g.dia^{-1}$ de superfibra. Foi utilizado um nível de significância de 10% para os testes estatísticos, além do contraste ortogonal para as análises de IgA, ao nível de 5% de significância. A resposta metabólica pós-prandial foi avaliada pela determinação dos índices glicêmicos e insulinêmicos, metabolismo de triglicérides, colesterol e frações HDL, LDL e VLDL. A resposta fermentativa a nível estomacal e fecal foi indicada pela determinação do pH, concentrações de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta. Ainda, o escore fecal foi avaliado quanto a cor e consistência. A atividade microbiana foi dada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA quanto às diversidades alfa e beta. A atividade inflamatória foi avaliada por meio de ultrassonografia transabdominal, fibrinogênio plasmático e concentração de IgA fecal. O comportamento foi avaliado individualmente e em grupo, por meio de etograma. O coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo foi maior (P = 0,0134) para o tratamento P1. As concentrações de IgA fecal foram maiores (P <0,0001) no grupo P2 e P3 pelo teste de Tukey e diferente entre todos os tratamentos (P<0,0335) por contraste ortogonal. A superfibra fonte de pectina foi totalmente aceita e consumida pelos cavalos. No comportamento avaliado individualmente, foi observada a redução

do ócio para P3 (P=0,0032). A suplementação com pectina não interfere na aceitabilidade, afeta o coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo, interfere na concentração de IgA fecal e melhora o comportamento dos equinos.

Palavras-chave: Cavalos. Fermentação. Microbiota. Saúde digestiva.

ABSTRACT

PEREIRA, R. A. **Pectin supplementation effect on horse's diet.** 2022, 113 FOLHAS. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

This study will evaluate the addition of different levels of pectin in the diet of horses included to high starch inclusion. Eight male horses, gelding, Arabian Horses, with an average weight of 439.75kg ± 34.89 kg and approximately 12 years old were used. 1.75% of body weight (BW) in the dry matter was provided in two daily meals, with water and mineral salt *ad libitum*. The experimental design was the contemporary double Latin square 4×4, with four diets evaluated in four periods of 22 days each, 15 days were destined for diet adaptation, 5 days for a total collection of feces (TCF), and 2 days for stomach contents collection. These periods were interspersed with 15 days of wash-out. Reference basal diet (BD) followed 40% roughage *Cynodon spp*. and 60% concentrated with high starch content (4.3 g.Kg-1 BW per day). The coproduct used resulted in 39.3% of pectin in dry matter. Treatment groups were CON) BD without coproduct addition; 2) BD + 120 g.day-1 by-product; 3) BD + 240 g.day-1 coproduct; 4) BD + 360 g.day-1 coproduct. A significance level of 5 and 10% was used for statistical tests, in addition to orthogonal contrast for IgA analyses, at 5%. The postprandial metabolic response was evaluated by determining glycemic and insulinemic levels, triglycerides metabolism, cholesterol and HDL, LDL, and VLDL fractions. The fermentative response at the stomach and fecal level was indicated by pH determination, lactic acid, and short-chain fatty acids concentrations. The fecal score was evaluated for color and consistency. Microbial activity was determined by 16S rRNA gene sequencing for alpha and beta diversity. Inflammatory activity was assessed by transabdominal ultrasound, plasma fibrinogen, and fecal IgA concentration. The behavior was evaluated individually and in groups, through an ethogram. The digestibility coefficient of ether extract was higher (P=0.0134) for treatment P1. Fecal IgA concentrations were higher (P<0.0001) in groups P2 and P3 by Tukey's test and differences between all treatments (P<0.0335) by orthogonal contrast. The pectin source coproduct was fully accepted and consumed by horses. In the behavior evaluated individually, a reduction in idleness was observed for P3 (P=0.0032). Supplementation with pectin does not interfere with acceptability, affects

the digestibility coefficient of ether extract, interferes with the concentration of fecal IgA, and improves the behavior of horses.

Keywords: Digestive health. Fermentation. Horses. Microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arquivos das avaliações de escore de condição corporal de cavalos Puro Sangue Árabe submetidos à dieta rica em amido com ou sem a adição de superfibra. 43

Figura 2. Fluxograma experimental ilustrando as atividades desenvolvidas em cada etapa dos períodos experimentais e entre os períodos.....44

Figura 3. À esquerda a superfibra utilizada adicionada via top dress no concentrado. À direita a dieta P3 fornecida no cocho.....46

Figura 4. Cavalo submetido a passagem de sonda nasogástrica e endoscópio para auxílio à localização da região de coleta do conteúdo estomacal.....50

Figura 5. Amostras fecais contendo síbalas íntegras em fundo branco para a avaliação do escore de fezes quanto a cor e consistência. 54

Figura 6. Imagem da avaliação ultrassonográfica transabdominal de equinos para a mensuração da espessura de parede intestinal. À esquerda avaliação das alças de cólon menor, e à direita de cólon dorsal direito. 58

Figura 7. Reprodução da tela de análise de dados comportamentais em baias, no software Intelbras Media Player®.....60

Figura 8. Área abaixo da curva da concentração de glicose plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.....65

Figura 9. Área abaixo da curva da concentração de insulina plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação do concentrado utilizado nas dietas referência. 44
Tabela 2. Composição bromatológica dos componentes das dietas. 45
Tabela 3. Composição bromatológica da superfibra. 47
Tabela 4. Características físico-químicas da superfibra. 47
Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos foward e reverse, utilizados na amplificação de DNA. 52
Tabela 6. Etograma para a avaliação de aceitabilidade (frequência) e tempo de consumo (minutos). 59
Tabela 7. Descrição dos comportamentos possíveis observados nos etogramas usados nestas avaliações. 61
Tabela 8. Peso corpóreo (kg) e escore de condição corporal de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação de diferentes teores de inclusão de pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 62
Tabela 9. Concentração de glicose plasmática (mg/dL.h-1) de equinos alimentados com dieta concentrada alto amido (4,3g de amido/100Kg PV) e suplementados com fonte de pectina avaliados em diferentes tempos (minutos). 63
Tabela 10. Concentração de insulina (mg/dL.h-1) de equinos alimentados com dieta concentrada alto amido (4,3g de amido/100Kg PV) e suplementados com fonte de pectina avaliados em diferentes tempos (minutos). 63
Tabela 11. Área abaixo da curva da concentração de glicose plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto teor de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina. 64
Tabela 12. Área abaixo da curva da concentração de insulina plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina. 64
Tabela 13. Concentração de triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 66
Tabela 14. Frequência Relativa (%) dos gêneros em comum presentes nas amostras estomacais de cavalos Puro Sangue Árabes alimentados com diferentes teores de inclusão de superfibra. 68

Tabela 15. Determinação do pH estomacal de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação de diferentes teores de inclusão de pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 70
Tabela 16. Concentração de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta no estômago de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 71
Tabela 17. Frequência Relativa (%) dos filos presentes nas amostras fecais de cavalos Puro Sangue Árabes alimentados com diferentes teores de inclusão de pectina.....73
Tabela 18. Gêneros de maior frequência relativa (%) entre os grupos de tratamento nas amostras fecais. 74
Tabela 19. Determinação do pH fecal, escore de cor e consistência (escala de 1 a 5) de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação de pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 76
Tabela 20. Concentração de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta em mMol/L nas fezes de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.....77
Tabela 21. Coeficientes de Digestibilidade Aparente dos nutrientes da dieta para cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 78
Tabela 22. Indicador inflamatório local de espessura de parede intestinal (mm) de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 80
Tabela 23. Comparação de médias por Tukey do indicador inflamatório local de concentração de Imunoglobulina A (IgA) nas fezes de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.....81
Tabela 24. Dosagem de fibrinogênio plasmático (mg/dL) de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 82
Tabela 25. Tempo de consumo médio das refeições de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 84

Tabela 26. Frequência diária (%) das manifestações comportamentais em baias de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 85
Tabela 27. Frequência diária (%) das manifestações comportamentais em pista de areia de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão. 86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico de análise de componentes principais (PCoA) de cavalos Puro Sangue Árabes suplementados com diferentes teores de inclusão de inclusão de pectina.....70
Gráfico 2. Gráfico de análise de componentes principais (PCoA) de cavalos Puro Sangue Árabes suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.....76

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....19

1 INTRODUÇÃO 21

2 OBJETIVOS 23

2.1 GERAL.....23

2.2 ESPECÍFICOS.....23

3 REVISÃO DE LITERATURA 24

3.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL EQUINO 24

3.2 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM EQUINOS 28

3.3 METABOLISMO LIPÍDICO EM EQUINOS 29

3.4 DINÂMICA FÍSICO-QUÍMICA NO INTESTINO GROSSO DOS CAVALOS 30

3.5 SÍNDROME INFLAMATÓRIA DIGESTIVA 32

3.6 O USO DE SUPERFIBRAS COMO FONTE DE ENERGIA NA DIETA DE EQUINOS 34

3.7 PECTINA 37

3.8 AVALIAÇÃO DE MICROBIOMA 38

3.9 ATIVIDADE MICROBIANA NO TRATO GASTOINTESTINAL DE EQUINOS .38

4 MATERIAL E MÉTODOS 42

4.1 LOCAL.....42

4.2 ANIMAIS.....42

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS.....43

4.4 INSTALAÇÕES E MANEJO 47

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA METABÓLICA PÓS-PRANDIAL 47

4.5.1 RESPOSTA GLICÊMICA 47

4.5.2 RESPOSTA INSULINÊMICA 48

4.6 METABOLISMO LIPÍDICO 48

4.7 ANÁLISE DA RESPOSTA FERMENTATIVA ESTOMACAL.....49

4.7.1 ÁCIDO LÁTICO.....50

4.7.2 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA.....51
4.7.3 DETERMINAÇÃO DO pH 51
4.8 AMOSTRAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RNA - MICROBIOMA 52
4.8.1 AMOSTRAS ESTOMACAIS E FECAIS 52
4.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FERMENTATIVA FECAL.....53
4.9.1 ESCORE DE FEZES.....53
4.9.2 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....54
4.9.3 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NAS FEZES.....55
4.9.4 DETERMINAÇÃO DO pH FECAL.....56
4.9.5 COLETA TOTAL DE FEZES.....56
4.9.6 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS NUTRIENTES DA DIETA.57
4.10 MARCADORES INFLAMATÓRIOS LOCAIS E SISTÊMICOS 57
4.10.1 ULTRASSONOGRAFIA TRANSABDOMINAL 57
4.10.2 FIBRINOGÊNIO PLASMÁTICO 58
4.10.3 QUANTIFICAÇÃO DE IgA FECAL.....58
4.11 COMPORTAMENTO 59
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....61
5 RESUTADOS E DISCUSSÃO.....62
5.1 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL 62
5.2 RESPOSTA METABÓLICA PÓS-PRANDIAL.....63
5.3 RESPOSTA FERMENTATIVA ESTOMACAL.....67
5.3.1 DINÂMICA BACTERIANA E INDICADORES FÍSICO-QUÍMICOS 67
5.4 RESPOSTA FERMENTATIVA FECAL 72
5.4.1 DINÂMICA BACTERIANA E INDICADORES FÍSICO-QUÍMICOS 72
5.4.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES DA DIETA 78
5.5 MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....80

5.5.1 RESPOSTA LOCAL 80
5.5.2 RESPOSTA SISTÊMICA 82
5.6 ACEITABILIDADE E COMPORTAMENTO 83
6 CONCLUSÕES 88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90
ANEXO A – SAL MINERAL UTILIZADO 112
ANEXO B – NÚCLEO EQUINO INCLUSO NA FORMULAÇÃO DA RAÇÃO BASE 113

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a movimentação anual do mercado equestre atingia R$ 16 bilhões em 2016. A estimativa do rebanho equino brasileiro em 2017 mostrou que este é o maior da América Latina, com aproximadamente 5,8 milhões de cabeças, divididos entre atividades de trabalho, lazer e esporte, e representando um crescimento de aproximadamente 12% entre os anos de 2006 e 2016 (LIMA & CINTRA, 2016).

Com a finalidade de suprir as exigências nutricionais dos cavalos como os de trabalho e esporte, é preciso aumentar a densidade energética da dieta. A utilização de coprodutos da agroindústria na alimentação equina é relevante por se tratar de uma alternativa ao uso de grãos, reduzirem a competição de alimentos entre seres humanos e animais, minimizarem os custos de produção dentro do sistema equestre, prevenirem a ocorrência de transtornos digestivos no cavalo e promoverem parâmetros semelhantes de aproveitamento e aceitabilidade de nutrientes e ingredientes (CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019).

Comumente o aumento da densidade energética nas dietas é dado pela redução das frações fibrosas e inclusão de concentrados baseados em grãos de cereais ricos em amido (RAIGOND et al, 2014). Porém, a alta capacidade fermentativa do amido pode predispor transtornos metabólicos, digestivos e comportamentais desencadeados pelo seu uso indiscriminado, representando um entrave na produção equestre. Para evitar estes problemas, uma interação equilibrada da microbiota e a manutenção do ambiente devem ocorrer (STEWART et al., 2017). Os alimentos fornecidos na dieta e suas proporções estão diretamente relacionados a modulação entre as comunidades bacterianas estabelecidas no trato gastrintestinal, que são determinantes e podem levar desde a queda de desempenho até a morte dos cavalos se as particularidades anatômicas e fisiológicas destes forem ignoradas (COSTA et al., 2012).

Diante das condições favoráveis do ambiente do trato gastrintestinal, bom estabelecimento das comunidades microbianas e equilíbrio destes, a ocorrência de desequilíbrios quantitativos ou operacionais são chamados de disbioses (IACOB & IACOB, 2019). O desequilíbrio ou perda de funcionalidade podem ocorrer por mudanças bruscas na dieta, manejo desfavorável, uso de antibióticos e anti-inflamatórios e até pelo uso de alimentos com alto teor de amido, alterando de forma acentuada o pH, produtos da fermentação e consequentemente o perfil das bactérias

presentes no trato digestório do cavalo. As consequências dessas alterações têm sido estudadas, mas prejuízos como mudanças nos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes da dieta já foram demonstrados (LINDBERG, 2013; CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019).

A busca por alternativas que reduzam os danos do excesso dos carboidratos não estruturais e mantenham o nível energético da dieta auxiliando a saúde digestiva dos cavalos é crescente. O uso de superfibras é uma delas, e é caracterizada por Duren (2000) como uma fonte de teores energéticos similares a grãos de cereais como a aveia e baixa deposição de lignina. Os carboidratos podem ser classificados como solúveis, rapidamente fermentescíveis e lentamente fermentescíveis (HOFFMAN et al., 2001). Os AGCCs como produtos da fermentação das superfibras foram associados à redução dos danos anteriormente citados, e podem melhorar o padrão das respostas glicêmica e insulinêmica no cavalo pela mudança da rota do metabolismo energético (JENSEN et al, 2014; KABE et al., 2016).

Por este motivo, são imprescindíveis os estudos abordando o uso de superfibras como fontes de pectina na dieta de cavalos como substitutos das frações de grãos de cereais ou como mediadores da ação destes ingredientes. Na nutrição equina, as superfibras mais comuns são a polpa de beterraba, polpa cítrica e casca de soja, todos coprodutos da indústria alimentar humana. A superfibra utilizada neste estudo é oriunda de polpa cítrica, largamente disponível no Brasil, e razões como a alta disponibilidade para aquisição, redução da competição por alimentos entre os mercados de nutrição humana e animal, e versatilidade do coproduto justificam o seu estudo e aplicação. Portanto, a hipótese deste estudo é de que a inclusão de superfibra como fonte de pectina na dieta é uma alternativa à suplementação nutricional de cavalos e melhora a saúde digestiva através do padrão fermentativo da dieta.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com pectina na dieta de equinos.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliação da resposta metabólica pós-prandial

a. Glicose e insulina

b. Perfil plasmático de triglicerídeos e colesterol

Analisar a resposta fermentativa estomacal

a. Caracterizar a dinâmica bacteriana do conteúdo estomacal

b. Avaliar a concentração de ácido lático

c. Determinar os perfis de ácidos graxos de cadeia curta e o pH

Avaliar a resposta fermentativa fecal

a. Escore de cor e consistência

b. Dinâmica bacteriana fecal

c. Concentração de ácido lático

d. Caracterizar os perfis de ácidos graxos de cadeia curta

e. Avaliação do pH fecal

f. Digestibilidade Total Aparente dos Nutrientes da Dieta

g. Marcadores inflamatórios locais e sistêmicos

Comportamento Equino

a. Analisar a aceitabilidade do alimento por meio do comportamento alimentar

b. Avaliação do comportamento

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL EQUINO

As particularidades anatômicas e fisiológicas da espécie equina devem ser observadas quando comparadas os hábitos naturais alimentares com o manejo e dietas atuais que visam suprir o aumento na demanda energética destes animais. A composição das dietas, quantidade ofertada de alimento, qualidade e disponibilidade dos alimentos fornecidos, e até hábitos alimentares como o pastejo contínuo foram alterados. Os hábitos naturais foram gradativamente substituídos, e as consequências da demanda imposta pelo homem refletem diretamente a saúde digestiva da espécie, na maioria das vezes prejudicando-a (ZEDER, 2012).

A digestão dos alimentos tem início na boca do cavalo por processo mecânico. A preensão do alimento acontece pelos dentes incisivos inferiores e superiores com auxílio da língua e lábios, que são moldados para permitir o acesso desde as partes mais baixas da forrageira, e assim o tamanho das partículas é reduzido em até 2 cm pelos pré-molares e molares, aumentando a superfície de contato dos nutrientes do alimento e facilitando o decorrer da digestão (FRAPE, 1998; PILLINER, 1999; BRANDI & FURTADO, 2009). A partir da cavidade oral do cavalo são encontrados pares de glândulas, sendo as submaxilares, sublinguais e as parótidas voltadas para a liberação de saliva (FRAPE, 1998). O tempo e frequência mastigatória estão diretamente relacionados com a produção de saliva, produzida em até 12 litros diários, agente umedecedor da digesta e, consequentemente, auxilia na deglutição do bolo alimentar. A saliva apresenta uma importante ação tamponante, já que é composta por aproximadamente 50 mEq/L de bicarbonato (FRAPE, 2008; GEOR, 2010), mas não possui atividade enzimática relevante (Al JASSIM, 2006). Ainda, a mastigação tem ação psíquica e representa uma atividade natural destes herbívoros essencialmente pastejadores (ELLIS & HILL, 2005), o que estimula a liberação de β-endorfinas e causa noção de saciedade (PAGAN, 1996).

O estômago é o primeiro órgão com ação digestiva relevante a receber os nutrientes oriundos da dieta (ERICSSON et al., 2016). Acredita-se que seja o primeiro compartimento onde, simultaneamente, ocorra a fermentação como geradora de energia, e a ação dos ácidos gástricos independentes de enzimas. A colonização do estômago por comunidades bacterianas foi demonstrada por de Fombelle et al., (2003) e os produtos então denominados de ácidos graxos voláteis (AGV) foram

associados a ação das bactérias residentes no estômago. O estômago apresenta uma capacidade de 13 a 18 litros, é altamente adaptado ao hábito de pastejo contínuo, e deve receber alimento de forma constante em pequenas quantidades (BRANDI & FURTADO, 2009). Este órgão apresenta uma taxa de retenção rápida, variando de 1 a 6 horas, de acordo com a natureza do alimento ingerido (THOMASSIAN, 2005; SANTOS et al., 2009). Anatomicamente, a *margo plicatus* é o marco entre as regiões antral (glandular, porção inicial), de pH entre 5 e 6, que é influenciado pela composição da digesta oriunda da cavidade oral, já que o poder tamponante da saliva e composição do alimento podem ou não favorecer a produção de AGV ou ácido lático, permitindo determinados grupos de bactérias se manifestarem (Al JASSIM, 2006; BRANDI & FURTADO, 2009), e a região dorsal (aglandular), com o pH variando entre 1,8 e 2,6 (Al JASSIM & ANDREWS, 2009), ambos em uma escala de 0 a 14.

Ainda no estômago do cavalo, o revestimento aglandular (*saccus caecus*) ocupa em torno de 33% do órgão e é o primeiro tecido sujeito ao processo fermentativo, devendo garantir um ambiente favorável às bactérias residentes. Já o revestimento glandular atinge cerca de 67% da região entre as áreas fúndica e pilórica, onde a primeira receberá as secreções de ácido clorídrico e pepsina, e a segunda de gastrina (de FOMBELLE et al., 2003; VARLOUD et al., 2007; BRANDI & FURTADO, 2009; MURRAY, 2009; MARTIN-ROSSET, 2015). Inicialmente, a fermentação e absorção dos nutrientes e ácidos resultantes foram sugeridas na região aglandular do estômago (NADEAU et al., 2003). Em seguida, a capacidade de absorção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi suposta nas regiões gástrica e pilórica do estômago equino, porém as informações sobre a sua capacidade de transporte na corrente sanguínea foram contestadas e devem ser estudadas (MUHONEN, 2008). Mesmo sem grandes evidências de um aproveitamento relevante neste órgão, Varloud et al. (2004) observaram a redução do amido entre 41% e 76% na transição do estômago para o intestino delgado, mas não foi especificada uma região responsável por sua degradação e absorção. Posteriormente, a absorção de ácidos orgânicos e de metabólitos da digestão estomacal foi reforçada por outros autores, mas a capacidade de transporte na corrente sanguínea não foi comentada (de FOMBELLE et al., 2003; VARLOUD et al., 2007; MUHONEN, 2008).

A transformação dos carboidratos não-estruturais como o amido e a sacarose em glicose ocorre a partir da digestão e absorção no intestino delgado (MCKENZIE, 2011). A borda em escova expressa as enzimas sucrase, lactase e maltase, variando

em proporção ao longo dos compartimentos para gerar os açúcares livres, frutoses, galactoses e glicose (DYER, 2002; HOFFMAN, 2009). Este compartimento pode atingir até 24 metros, é dividido entre duodeno, jejuno e íleo, e conta com um tempo de retenção da digesta que pode variar de 1,5 a 3 horas (THOMASSIAN, 2005). No intestino delgado, o início da digestão enzimática dos nutrientes, em suma, diluídos na fração líquida da digesta, como o conteúdo celular de forrageiras, os carboidratos não estruturais, proteínas e lipídios, além de absorver moléculas já reduzidas a monossacarídeos, aminoácidos e até peptídeos. As terminações α-1,4 são limitadas a clivagem da molécula pela α-amilase pancreática, passam por hidrólise, e as ligações α-1,6 devem sofrer a ação das amilopectinases. Estas moléculas de ligações α-1,4 estão sujeitas a ação de enzimas secretadas pelo pâncreas de forma contínua. Estes processos compõem a fase luminal e geram dissacarídeos e oligossacarídeos (HOFFMAN, 2009; RICHARDSON & MURRAY, 2016).

Nos equinos, a ausência da vesícula biliar, faz com que a bile seja liberada de forma constante na região duodenal, a partir do fígado e independente da presença de alimentos (MORGADO, 2009; Al JASSIM & ANDREWS, 2009). Ainda, serão secretados íons bicarbonato, nucleotidases e água, que participarão de grande parte da hidrólise no intestino delgado. Estas secreções são estimuladas pela presença de alimento no compartimento e tem ação corretora do pH da digesta oriunda do estômago, elevando-o em torno de 7. A existência de uma região fermentativa na porção distal com ação de bactérias gram-positivas anaeróbicas ainda passa por estudos que visam demonstrar se este processo existe de forma independente ou como ocorrência de refluxo do conteúdo do intestino grosso (GOBESSO et al., 2008; FRAPE, 2008; HOFFMAN, 2009; MARTIN-ROSSET, 2015; ERICSSON et al., 2016). A absorção da glicose no intestino delgado depende do cotransporte ocorrido na membrana luminal do intestino e células epiteliais absortivas, o Na^+/Glicose tipo I, chamado de SGLT-1 que utiliza adenosina trifosfato (ATP) para ativar a cascata que conduzirá a glicose do lúmen aos enterócitos através da borda em escova, e em seguida, os transportadores facilitadores de glicose (GLUT2) que trabalham por difusão facilitada para liberar gradativamente a glicose internalizada pelos eritrócitos na corrente sanguínea (JOOST & THORENS, 2001; DYER et al., 2009; HOFFMAN, 2009; ARAUJO & MARTEL, 2015).

O intestino grosso é segmentado inicialmente em ceco e cólon maior (cólon ventral direito e esquerdo), divididos por flexuras que representam pontos de alteração

significativa das comunidades bacterianas (BRANDI & FURTADO, 2009). A capacidade líquida pode chegar a 220 litros, anatomicamente representa até 60% de todo o trato gastrointestinal, já que a ação bacteriana demanda maior tempo de retenção do que as ações enzimáticas anteriores para a digestão de carboidratos e proteínas (FRAPE, 2008; MARTIN-ROSSET, 2015; ERICSSON et al., 2016). Segundo Thomassian (2005), o tempo de retenção pode variar de 34 a 45 horas entre as câmaras do ceco, cólon maior, cólon menor e o reto. Julliand et al. (2001) citam que no decorrer do intestino grosso apenas a secreção mucosa é liberada, sendo inexistente qualquer secreção enzimática voltada para a digestão de nutrientes, reforçando a ação bacteriana e protozoária nestes sítios. A obtenção de energia ocorre a partir da fermentação, principalmente das frações fibrosas dos substratos, pelos microrganismos residentes no ceco e cólon, onde os componentes estruturais complexos são expostos a ação de enzimas liberadas pelas bactérias residentes, sendo estas amilolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas, precursoras de celobioses, glicose e xiloses, e enzimas pectinolíticas geradoras de moléculas de ácido galacturônico (JULLIAND & GRIMM, 2017).

A absorção das moléculas de AGCC ocorre por difusão passiva e tem relação direta com o peso molecular de cada uma delas e, quanto menor o peso molecular, maior a taxa de absorção do ácido (BRANDI & FURTADO, 2009). A absorção de sódio e água são necessárias para auxiliar o processo (GUSTAFFSON, 2004), já que a difusão se dá pela troca dos AGCC deionizados junto ao NaCl por íons H^+ e bicarbonato, tendendo a tamponar o meio (BRYDEN, 1995; CLARKE et al., 1990; FRAPE, 1998; CUNNINGHAM, 2004). A redução do pH dada pelo acúmulo de ácidos fortes, como o ácido lático, diminui o potencial de absorção dos ácidos de menor peso molecular, pois o desequilíbrio entre o pKa dos ácidos presentes no meio e o pH intestinal dificulta o processo dissociativo da molécula (BAILEY, 2003). Por fim, o transporte dos AGCC absorvidos ocorre via sistema porta hepático na forma de ânions (BRANDI & FURTADO, 2009). Em seres humanos, duas vias de absorção de AGCC foram propostas, sendo elas a difusão passiva de ácidos não dissociados e o transporte ativo de ânions dissociados, neste último caso envolvendo transportadores específicos (SELLIN, 1999). Um dos transportadores o qual acopla a importação dos AGCC em troca de íons bicarbonato não tem identificação, os demais foram identificados como MCT1 (e variações) e SMCT1, e estão descritos em um estudo de Besten et al. (2013).

3.2 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM EQUINOS

O metabolismo de carboidratos é possível a partir de duas vias de obtenção de energia extracelulares, sendo elas a absorção de monossacarídeos pelo intestino delgado, e o aproveitamento dos AGCC no intestino grosso, além da utilização de fontes energéticas intracelulares em momentos específicos. A via metabólica que será utilizada está diretamente relacionada a composição da dieta, manejo dietéticos e *status* do animal, e foram demonstradas a partir de alterações na dieta dos cavalos por alguns autores (GEELEN et al., 1999; HALLEBEEK & BEYNEN, 2001; 2002). As exigências energéticas basais de um cavalo têm relação direta com a manutenção das concentrações normais da glicose sanguínea, é o primeiro determinante da ativação da via glicólise, onde as moléculas de glicose serão carreadas por intermédio da insulina para as células envolvidas no processo (ARAI et al., 1994). Quando a demanda por energia imediata é suprida de forma constante e o substrato energético continua disponível, a insulina direciona as moléculas de glicose para que sejam estocadas como glicogênio pelas células parenquimatosas do fígado, células musculares ou miócitos, e adipócitos, via glicogênese (STOCKHAM e SCOTT, 2008b).

É possível induzir mudanças na resposta hormonal a partir da composição da dieta, frequência de fornecimento e proporção dos alimentos, o que pode ser uma estratégia para garantir a disponibilidade de energia para o cavalo ao longo do tempo. Esta condição pode ser avaliada pela expressão da área abaixo da curva durante um período conhecido dos índices glicêmicos e insulinêmicos, e irá demonstrar a velocidade com a qual a glicose é disponibilizada na corrente sanguínea, a concentração gerada e o tempo utilizado para que os valores basais sejam estabilizados (PI-SUNYER, 2002; VERVUERT et al., 2004; GOBESSO et al., 2009). O jejum, o estado pós-absortivo, a dieta restrita e o esgotamento do glicogênio muscular, são sinalizadores de que há necessidade de o organismo retomar a produção de glicose ou recompor as reservas energéticas do cavalo. Durante o jejum ou restrição dietética, a queda dos índices glicêmicos influencia o aumento da circulação do hormônio glucagon, um hormônio hiperglicêmico, estimulante de enzimas geradoras de energia por, principalmente ativação da gliconeogênese no substrato hepático. Neste caso, a liberação de insulina mesmo que constante, passa

a ocorrer em concentrações basais, já que este hormônio age como inibidor gliconeogênico. Esta dinâmica ocorre para evitar um quadro hipoglicêmico no cavalo e como estimulante da via lipólise (BRUSS, 2008; KANEKO et al., 2008; MELO et al., 2010). Neste sentido, é importante ressaltar o conhecimento acerca das respostas plasmáticas resultantes do metabolismo de carboidratos, já que a insulina circulante é peça chave no desenvolvimento dos casos de laminite, resistência à insulina e cólica aqui relatados (BIDDLE et al., 2013).

Em casos em que os cavalos são submetidos a algum grau de esforço, a glicose sanguínea passa a ter um papel de menor relevância na geração de energia. A acidificação do meio dada pela produção do ácido lático muscular está associada à liberação de íons H^+, que é um dos inibidores da fosfofrutocinase envolvida na glicólise. Como alternativa, dá-se início a gliconeogênese a partir do ácido lático gerado pelo metabolismo anaeróbico ou a partir dos estoques do tecido muscular e hepático (WOLINSKY & HICKSON, 1994; MACLEAY, 2004). Desta forma, deve-se observar que o glicogênio muscular não é utilizado para disponibilizar glicose na corrente sanguínea e sim piruvato e lactato, já que a enzima glicose-6-fosfatase (G6PD) necessária para transformar a glicose-6-fosfato em glicose, está ausente nos tecidos musculares, dando início ao chamado Ciclo de Cori. A partir destes precursores, a ressíntese de glicose ocorrerá pela ação de enzimas específicas no fígado, sendo elas a piruvato carboxilase, fosfenopiruvato carboxiquinase e a glicose-6-fosfatase (KANEKO, 2008).

3.3 METABOLISMO LIPÍDICO EM EQUINOS

A absorção da gordura dietética é realizada ainda no intestino delgado e as moléculas serão carreadas na forma de quilomícrons, via lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoptroteína de alta densidade (HDL). Estes intermediários auxiliarão no transporte pela corrente linfática até a corrente sanguínea para destinar as moléculas às devidas rotas metabólicas (GEELEN et al., 2001a; MCKENZIE, 2011). Em casos específicos como o jejum, a utilização de energia a partir do tecido adiposo será mediado pelas mesmas proteínas, sendo as moléculas retiradas do fígado e levadas aos tecidos periféricos, onde os triglicerídeos sofrerão a ação da lipase para a liberação de seus compostos (STOCKHAM, 1995; MCKENZIE, 2011).

3.4 DINÂMICA FÍSICO-QUÍMICA NO INTESTINO GROSSO DOS CAVALOS

A avaliação das fezes é um método não invasivo que, por meio de indicadores bioquímicos e físico-químicos, pode ajudar a entender a dinâmica intestinal (SANTOS et al., 2009). O manejo nutricional e alterações dietéticas comumente predispõem as alterações no seu funcionamento, o que poderá ser demonstrado por meio da determinação do pH nas fezes, concentração de AGCC e escore de fezes quanto aos teores de umidade, coloração e textura, respostas do processo dinâmico do trato gastrointestinal dos cavalos (ZEYNER et al., 2004; GONÇALVES et al., 2006; GODOI et al., 2009). Em um primeiro momento, Meyer (1995) reconheceu que a regularidade da defecação, consistência, forma física e odor das fezes deveriam ser considerados para indicar alterações induzidas pela dieta durante a passagem pelo trato gastrintestinal equino, respaldando as avaliações físicas das fezes e de bem-estar destes animais. Jones et al. (2002) citam que o pH do meio é um dos fatores mais determinantes para a efetividade da ação microbiana degradadora de carboidratos estruturais e não estruturais no intestino grosso do cavalo, já que está envolvido na manutenção do equilíbrio deste ambiente.

Inicialmente, foi relatado que o pH 6 no intestino grosso evidenciou a ação de bactérias degradadoras de pectina e hemicelulose (BONHOMME-FLORENTIN, 1988), sendo que mais tarde, Frape (2008) sugeriu novos valores próximos a 6,5. Em seguida, alguns autores relataram que valores de pH estimados nas fezes abaixo de 6, em uma escala de 0 a 14, poderia ser associado a inibição de bactérias celulolíticas e aumento da ação dos *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp*, bactérias amilolíticas produtoras de ácido lático (Al JASSIM & ROWE, 1999; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al, 2003). Dada a importância das condições do meio gastrointestinal, mais especificamente no intestino grosso, é preciso ressaltar que a produção rápida e excessiva de ácido lático se torna preocupante quando é suficiente para que haja a lise de espécies *Enterbacteriaceae,* que são bactérias gram-negativas conversoras de ácido lático em propionato, além de aumentar a concentração de endotoxinas na corrente sistêmica. Isto ocorre, pois, a maioria das bactérias gram-negativas são intolerantes à redução drástica do pH do meio (HARRIS, 1997; BAILEY, 2003). Reduções drásticas, recorrentes e persistentes de pH no trato gastrointestinal estão

associadas às ocorrências de quadros inflamatórios nos cavalos (Al JASSIM & ROWE, 1999).

Vários autores utilizaram de avaliações físico-químicas e determinaram que a dieta influenciou alterações fecais dos indicadores de pH e AGCC (ZEYNER et al., 2004; BERG et al., 2005) e escore fecal (SANTOS et al., 2009). Um estudo realizado por Jensen et al. (2016) pode ajudar a entender melhor a relação do perfil de carboidratos fornecidos na dieta com as respostas físico-químicas durante o trato gastrointestinal dos cavalos. É evidente uma queda pós-prandial no pH cecal dos cavalos, porém é notório que dietas a base de amido causam um impacto mais acentuado momentâneo e ao longo do tempo em relação a dietas fibrosas. Em dietas com base no fornecimento de cevada, o ácido propiônico esteve em evidência quando avaliado ao longo do tempo conforme os AGCCs foram aumentados. Para dietas fibrosas a proporção de ácido acético foi maior. Na literatura, os ácidos acético e butírico foram citados como fornecedores de moléculas de carbono para a síntese lipídica, enquanto o propiônico foi associado a geração de glicose no fígado pela gliconeogênese, como em casos específicos anteriormente citados (NRC, 2007; FRAPE, 2008). Recentemente foi demonstrada alguma atividade favorável do ácido butírico para a manutenção dos colonócitos (BEDFORD & GONG, 2018). As bactérias utilizadoras de amido e celulose utilizarão da via glicolítica para a produção de piruvato a partir da maltose, glicose e celobiose.

As ligações β-1,4 fazem parte da estrutura das pectinas, frutanas, oligossacarídeos e lignocelulose. As enzimas endógenas necessárias para a quebra e aproveitamento destas estruturas estão ausentes no cavalo, mas são liberadas pelos microrganismos utilizadores de fibras (HALL, 2003; HOFFMAN, 2009). A correlação positiva entre a inclusão de alimentos volumosos e produção de AGCC está diretamente relacionada à modulação de pH do meio, já que a fibra é um alimento potencialmente tamponante (KABE, 2016). Mesmo que haja disponibilidade de alimentos concentrados e volumosos, o aproveitamento dos AGCC dependerá das características do meio. A ação das bactérias que utilizarão os substratos apenas ocorrerá em condições ideais de pH para cada grupo de bactérias, e não apenas pela presença de determinado alimento (NRC, 2007; BRAGA, 2008; RICHARDSON et al., 2016). Além dos produtos ácidos favorecerem rotas metabólicas energéticas, como uma via de mão dupla estes também influenciarão positiva ou negativamente o pH luminal, melhorando ou piorando o aproveitamento dos nutrientes da dieta, causando

ou evitando distúrbios metabólicos ou até mesmo disbioses (NRC, 2007; BRAGA, 2008; SANTOS, 2009).

Portanto, baseado na triangulação entre a produção ácida, pH e modulação microbiana pela dieta, torna-se nítida a importância da avaliação destes fatores bioquímicos em conjunto, e não no sentido bidirecional como dose-resposta da dieta como influenciadora de cada parâmetro isoladamente (FERNANDES, et al., 2014; CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019).

3.5 SÍNDROME INFLAMATÓRIA DIGESTIVA

O desbalanço causado pelo excesso de amido nas dietas foi relacionado à algumas doenças inflamatórias. As doenças ocorreram como consequências das alterações ambientais a partir da fermentação do amido em ácido lático, o que pode causar disbioses e prejudicar os pilares regulatórios do bom funcionamento da barreira gastrointestinal e acarretar casos de laminite, endotoxemia, colites, desconfortos abdominais e diarreias (BIDDLE et al., 2013; STEWART et al., 2017; MARYCZ et al., 2018), bem como propiciar a ação de defesa de bactérias potencialmente patogênicas ao cavalo que normalmente estão em equilíbrio com as comunidades locais (JULLIAND & GRIMM, 2017). Também foram relatados distúrbios como a síndrome metabólica equina, processos inflamatórios, doença de Cushing e acidose fermentativa (COHEN et al., 1999; AL JASSIM & ANDREWS, 2009).

Iacob & Iacob (2019) definiram como as bases da barreira gastrointestinal a boa condição epitelial, a capacidade de resposta imune e as interações das comunidades microbianas. Estas interações refletem em benefícios ao hospedeiro, relações ecológicas de comensalidade, equilibram o sistema gastrintestinal do cavalo e agem como melhoradores do desenvolvimento celular, competem com microrganismos patogênicos, além de converter matéria prima em nutrientes aproveitáveis pelo equino (STEWART et al., 2017). Alterações no ambiente fermentativo ocorridas por desequilíbrio entre as comunidades bacterianas, desbalanço ou mudanças nutricionais e fatores que impeçam a manutenção da homeostase local, comprometem os pilares da barreira gastrointestinal e ocorrem nas doenças inflamatórias anteriormente citadas (DOUGAL et al., 2013; MARTIN et al., 2017; IACOB & IACOB, 2019).

Cipriano-Salazar (2019) aponta para a importância de se avaliar a qualidade dos ingredientes utilizados na dieta que podem representar um agravante para os quadros de distúrbios intestinais. O trato gastrointestinal equino em condições saudáveis favorece a troca de nutrientes, íons e outros compostos por transporte ativo pela membrana da parede intestinal, estrutura determinante para a saúde deste ambiente e, consequentemente, do indivíduo. A atividade absortiva depende da permeabilidade da membrana intestinal que, em casos de ação patogênica ou doenças inflamatórias locais, diminuirá a efetividade de absorção, seleção e defesa da barreira intestinal (STEWART et al., 2017). Estas alterações podem ser identificadas pelo uso de ferramentas que indiquem a resposta local de um quadro inflamatório ou sistêmico. Como alternativa surge o uso das ferramentas de imagem para avaliar a estrutura do trato gastrointestinal, e permitem visualizar seções específicas como o cólon dorsal direito de cavalos sujeitos a alterações intestinais e complementa outros métodos de diagnóstico (FREEMAN, 2002; BUCHANAN et a., 2006; BECCATI et al., 2011). Mudanças na espessura das células da parede intestinal podem ser causadas por doenças inflamatórias intestinais, dentre elas as ocasionadas pela dieta e desequilíbrio do ambiente fermentativo (SCHUMACHER et al., 2000; JONES, et al., 2002). Estudos apontaram resultados satisfatórios para avaliações ultrassonográficas transabdominais percutâneas para a mensuração não invasiva do trato gastrointestinal equino e a espessura de estruturas intestinais (FREEMAN, et al., 2001; BECCATI et al., 2011).

Outro indicador local de inflamação é a produção de Imunoglobulina A (IgA) como mecanismo de defesa da mucosa intestinal. Trata-se de uma resposta adaptativa realizada por células B que produzem a IgA, como primeira linha de defesa, o que resultará na produção ou não dos chamados “anticorpos IgA secretores”, os SIgA (MAZANEC et al., 1993; BRANDTZAEG & JOHANSEN, 2005). No primeiro mês de vida do cavalo inicia-se a produção endógena desta imunoglobulina por células de defesa da lâmina própria da mucosa (BEMARK, et al., 2012), que foi indicada por alguns autores como relevante para o controle de infecção entérica do potro (JENVEY et al., 2012). A concentração de IgA nas fezes não foi completamente elucidada em cavalos (RILEY et al., 2020), mas foi associada a doenças inflamatórias intestinais em seres humanos (BRANDTZAEG, 2010).

A determinação do fibrinogênio plasmático pode ser um aliado para identificar uma resposta inflamatória sistêmica frente aos desafios dietéticos. Caracterizada

como uma proteína de fase aguda, é produzida pelos hepatócitos e os valores de referência em equinos variam entre 200mg/dL e 400mg/dL (MONTGOMERY et al., 1996; BORGES et al., 2007; EVANS et al., 2008), e suas concentrações máximas são atingidas em 48 ou até 72 horas após o início do estímulo inflamatório (LONG, & NOLEN-WALSTON, 2020). Esta ferramenta tem sido utilizada com consistência para apontar processos inflamatórios decorrentes de situações estressantes como o exercício (BASTOS et al., 2016), transporte (OERTLY et al., 2021) e na nutrição equina (COPAS et al., 2013; OCHONSKY, 2017; BASTOS, 2021).

3.6 O USO DE SUPERFIBRAS COMO FONTE DE ENERGIA NA DIETA DE EQUINOS

A definição de superfibra tem sido baseada nas características bromatológicas do alimento. Este grupo abrange as fibras altamente fermentescíveis, ou seja, um grupo de alimentos com proporções de fibras dietéticas favoráveis a disponibilização de nutrientes para o indivíduo após o processo fermentativo. Ainda, uma baixa relação entre lignina e fibras deve ser observada, pois facilita o acesso das bactérias essencialmente fibrolíticas (DUREN, 2000).

As fontes de pectina, celulose e hemicelulose ocupam parcelas significativas de coprodutos da indústria de hortifrutigranjeiros, dentre eles são destaques a polpa cítrica, polpa de beterraba e a casca de soja em menor escala (FURTADO et al., 2011). A degradação da hemicelulose, celulose, pectinas e carboidratos da parede celular do alimento será responsável pelos AGCC gerados, suprindo até 70% da demanda energética do cavalo em mantença. Estes compostos resistem à ação hidrolítica no intestino delgado, sendo submetidas posteriormente à degradação por enzimas microbianas no intestino grosso (ARGENZIO et al., 1974; BIDDLE et al., 2013; JULLIAND & GRIMM, 2016). A digestão de alimentos ricos em pectina gera ácido galacturônico, componente que pode contribuir para o equilíbrio das reações bioquímicas no trato gastrointestinal equino, uma vez que este composto é um potencial tamponante e pode aumentar a estabilidade do meio para promover a ação de bactérias celulolíticas (GILAVERTE et al., 2011). Uma pesquisa realizada para testar os diferentes teores de inclusão de pectina para cavalos comprovou que a inclusão de 3% de pectina causou um aumento linear na relação da concentração

versus digestibilidade aparente da hemicelulose em feno *Coast-cross* (OLIVEIRA et al., 2002).

O fornecimento de fibras de qualidade para os equinos é de suma importância e o uso de superfibras tem sido estudado no Brasil. A casca de soja apresenta, em média, um teor de 66,45% de fibra em detergente neutro na matéria seca, e 49,24% de fibra em detergente ácido, além de um valor de energia digestível próximo à polpa de beterraba, por exemplo (RICHARDSON et al., 2016; VALADARES FILHO et al., 2018). O teor de proteína bruta da casca de soja foi comparável aos fenos de gramínea altamente qualificados, em média 11% (QUADROS et al., 2004). Quadros et al. (2004), encontraram uma relação linear entre o percentual de pectina presente na casca de soja e a melhora na digestibilidade de nutrientes como a matéria seca, fibra bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. O estudo foi baseado na substituição de feno *Cynodon spp.* (Tifton 85) por percentuais de 0%, 33,3%, 66,6% e 100%, mas os autores preconizam o a inclusão máxima de 40% na matéria seca para evitar interferências no desempenho dos cavalos. As características de higroscopicidade dada pela composição bromatológica, mais precisamente pela pectina presente na casca de soja, permitem um controle hidroeletrolítico satisfatório, o que pode auxiliar no controle das características físico-químicas do ambiente fermentativo (MOORE-COLYER et al., 2000), já que a alta capacidade de retenção de água e eletrólitos da casca de soja altera a viscosidade da digesta, influenciando na taxa de passagem e auxiliando positivamente os indicadores físico-químicos de saúde digestiva em cavalos em exercício moderado (FURTADO et al., 2011).

Uma superfibra de destaque na alimentação de equinos é a polpa de beterraba. A composição bromatológica apresenta, em média, 45,60% de fibra em detergente neutro e 25,60% de FDA (VALADARES FILHO et al., 2018). MARTIN-ROSSET & MARTIN (2015) apresentaram valores de até 51,10% de fibra em detergente neutro e 25,90% de fibra em detergente ácido. A polpa de beterraba representa um coproduto de baixa lignificação e alta fermentabilidade, vantagem do ponto de vista de aproveitamento para o cavalo (BRANDI & FURTADO, 2009), além de reduzir as reações deletérias ao intestino grosso causados pela fermentação de fontes como o amido (LINDBERG & KARLSSON, 2001). Em um estudo comparativo entre ingredientes com altos teores de fibra (feno peletizado, polpa de beterraba e casca de aveia), os autores não observaram alterações no pH cecal de pôneis, em média pH 6 (MOORE-COLYER et al., 2000). A polpa de beterraba também foi utilizada incluída,

além de outros alimentos, como fonte de pectina na dieta de equinos. Os percentuais de inclusão foram com base na matéria seca em 0%, 1%, 2% e 3% de pectina ao feno *Coast-cross*. Neste estudo o pH fecal foi estável para todos os teores de inclusão, mas uma regressão linear permitiu identificar que 1,25% de inclusão melhorou a digestibilidade aparente da proteína bruta, além do coeficiente de digestibilidade aparente da hemicelulose com 3% de inclusão (OLIVEIRA et al., 2002). Segundo Crandell et al. (1999), dentre os produtos oriundos dos grãos de cereais, a substituição por óleo ou polpa de beterraba, o coproduto demonstrou uma redução na glicemia e insulinemia dos cavalos. A adição de polpa de beterraba também foi considerada por Jessen et al. (2016) determinante na combinação de dietas que apresentaram maiores concentrações de AGCC nas fezes.

A polpa cítrica é um coproduto da indústria de laranja, obtida em larga escala no Brasil. A utilização da polpa cítrica peletizada como substituta dos grãos que compõem a fração energética nas dietas animal tem como vantagem o baixo custo em relação aos ingredientes comumente utilizados. A porção de açúcares totais é expressivamente alta e a concentração de amido é baixa (RETORE, 2010). Assis et al. (2004) apontaram as vantagens da utilização deste coproduto em relação às dietas a base de amido, mostrando que a fermentação de alimentos à base de pectina não causa redução brusca do pH evitando, por exemplo, a acidose intestinal no cavalo. Em contrapartida, um dos entraves para a utilização da polpa cítrica peletizada na dieta de equinos é a questão de aceitabilidade. Ott et al. (1979) já apontavam que a aceitabilidade da polpa cítrica torna seu fornecimento limitado para cavalos, limitando sua aceitação em 15% de inclusão. Alguns estudos foram realizados visando quantificar a palatabilidade dos alimentos (OTT et al., 1979; MANZANO et al., 1999; COVERDALE et al., 2004), o qual é definida por questões sensoriais segundo Hill (2007) e Carciofi (2008), em que aspectos sensoriais de mastigação e deglutição, tamanho de partícula, forma, textura, odor e paladar são considerados. Assim como outras superfibras, a polpa cítrica apresenta alta capacidade de retenção de água (aumento da viscosidade), porém contribui para a elevada adsorção de sais biliares quando comparada a outros materiais fibrosos (VAN SOEST, 1994), característica esta que deve ser considerada com cautela. Segundo observações de Ott et al. (1979), 80% dos cavalos recusaram uma dieta contendo 30% de polpa cítrica, consumindo no máximo 8,6% da dieta ofertada. Ainda, o consumo foi avaliado por 14 dias e não houve alterações nas manifestações de preferência e ingestão, os autores

associaram os resultados ao odor do ingrediente. Tribucci et al. (2013), reforçam ainda a preferência dos cavalos por dietas contendo até 14% por de inclusão da polpa cítrica, observando baixas ações de busca dos cavalos por tratamentos propostos contendo 21% ou 28% do alimento, durante a primeira ação.

3.7 PECTINA

A pectina é um carboidrato que compõe a parede estrutural dos alimentos, mais especificamente na lamela média e parede primária celular vegeral, integra o grupo dos polissacarídeos não amiláceos (EZEQUIEL & GALATI, 2005; MORGADO, et al., 2009). Está presente em quantidades relativamente baixa em gramíneas tropicais (2 a 5%), mas ocupam parcelas significativas de coprodutos da indústria de hortifrutigranjeiros, como a casca de soja, polpa de beterraba e polpa cítrica, e tem se mostrado uma alternativa viável e promissora à competição de alimentos entre seres humanos e animais, redução dos custos de produção, e vantagens metabólicas para o cavalo (FURTADO et al., 2011).

A diferença entre as pectinas e o amido é estrutural. A estrutura das pectinas não sofre ação degradante direta das enzimas secretadas antes de atingir o intestino grosso, sendo dependente do processo fermentativo realizado por bactérias específicas (MORGADO et al., 2009). As substâncias pécticas são formadas por vários polímeros de ácido galacturônico. Estas moléculas variam em termos de grau de metoxilação, quanto maior o grau, maior a capacidade de retenção de água, um dos responsáveis pela alteração da viscosidade e taxa de passagem no trato gastrointestinal animal e, consequentemente, se torna um agente tamponante do meio. Porém, a sequência de estudos aponta que a viscosidade ainda pode ser afetada pelo pH do ambiente, teores de sólidos solúveis e disponibilidade de cátions divalentes (VAN SOEST, 1994; PAIVA et al., 2009; GILAVERTE et al., 2011).

A pectina é um polissacarídeo de alta fermentação, e o acetato é o ácido graxo de cadeia curta de maior proporção resultante deste processo (OLIVEIRA et al., 2002; GILAVERTE et al., 2011). O ácido acético está envolvido nas rotas geradoras de energia para o cavalo, fornecendo moléculas de carbono (NRC, 2007; FRAPE, 2008). Alguns autores citam que sua produção supre até 30% da energia requerida para membros posteriores de cavalos em atividade, a partir de sua oxidação. Quando não é utilizado de imediato, pode compor o armazenamento energético como forma de

ácidos graxos de cadeia longa ou, em caso de éguas lactantes, passar a compor o leite (PETHICK et al., 1993; BRANDI & FURTADO, 2009).

3.8 AVALIAÇÃO DE MICROBIOMA

Para entender a modulação microbiana no cavalo, é necessário atualizar os conceitos vinculados aos métodos de identificação e quantificação destes microrganismos. Diante de termos gerais, a palavra microbiota é usada para definir todos os indivíduos existentes no ambiente estudado, incluindo *archeas*, bactérias, fungos, protozoários e vírus. A referência ao termo táxon se dá para abranger os reinos, filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies, onde “população microbiana” fará referência às unidades que compõem um táxon específico (COSTA & WEESE, 2019).

A alfa diversidade é o termo utilizado para as avaliações mediante uma única amostra. Este termo definirá questões relacionadas à riqueza da amostra, ou seja, a quantidade numérica de um determinado táxon identificado naquela amostra. A equidade é usada para ilustrar a distribuição dos táxons identificados e quantificados pela riqueza, e é dado em porcentagem de acordo com a frequência de cada táxon em relação ao número total identificado. A beta diversidade é usada visando entender a dissimilaridade, a distância ou proximidade das comunidades bacterianas entre as amostras (COSTA & WEESE, 2019).

3.9 ATIVIDADE MICROBIANA NO TRATO GASTOINTESTINAL DE EQUINOS

A dieta é dada como um dos fatores mais impactantes em vários aspectos deste estudo. Em relação à dinâmica das populações microbianas não é diferente, esta pode ser influenciada a partir dos erros no manejo alimentar, alterações bruscas entre dietas essencialmente fibrosas ou compostas por grãos, processamento de ingredientes ou frequência de fornecimento da ração (HANSEN et al., 2015; VENABLE et al., 2017), afetando diretamente a estabilidade das populações microbianas (DALY et al., 2012; DOUGAL et al., 2014). Toda a extensão do trato gastrointestinal equino apresenta a composição da microbiota e funções características, sendo ambientes que necessitam manter a homeostase para garantir a saúde do cavalo (ERICSSON et al., 2016). Foi comprovado que a atividade

fermentativa começa no estômago dos cavalos realizada por grupos resistentes ao ambiente ácido e instável (de FOMBELLE et al., 2003; VARLOUD et al., 2007), e que não existem grandes diferenças entre a microbiota das regiões glandular e aglandular do estômago do cavalo (PERKINS et al., 2012; ERICSSON et al., 2016). Contudo, há uma alta variabilidade da microbiota local entre indivíduos, já que o estômago é altamente susceptível à entrada constante de bactérias ambientais carreadas pelo alimento e o contato com o meio externo, população microbiana residente no alimento fornecido e eventuais contaminações (ERICSSON et al., 2016).

Em casos de dietas baseadas em grãos de cereais, quanto mais amido é fornecido ao cavalo, maior é a possibilidade de escape de partículas de amido do intestino delgado que atingem o ambiente fermentativo do intestino grosso, aumentando assim as atividades de *Lactobacillus spp.* e *Strepcococcus spp,* e a produção láctica (HOFFMAN, 2009). Segundo Braga (2008), caso as concentrações de ácido lático superem a capacidade tamponante local pode haver a redução do pH do meio, inibindo a ação de bactérias, como as essencialmente fibrolíticas e causando desequilíbrio entre as comunidades bacterianas. No mesmo sentido, a redução no fornecimento de alimentos volumosos para cavalos tem demonstrado a redução da abundância das famílias *Lachnospiraceae, Ruminoccoccaceae* e *Fibrobacter* spp (DALY et al., 2012; HANSEN et al., 2015). Trabalhos reunidos por Julliand & Grimm (2017), demonstraram que as dietas ricas em amido promoveram maior atividade do filo *Proteobacteria,* sendo *Succinivibrio* o gênero em maior abundância, observando em contrapartida a redução da ordem *Crostidiales* e família *Lachnospiraceae.* resumindo os achados em aumento de bactérias produtoras e consumidoras de lactato, e diminuindo as bactérias essencialmente fibrolíticas (BIDDLE et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; DOUGAL et al., 2014).

Neste sentido, Ericsson et al. (2016) realizaram um estudo visando a caracterização de segmentos do trato gastrointestinal de 9 cavalos adultos *pós-mortem*, livres de impedimentos metabólicos ou digestivos. Os resultados mostraram uma alta incidência dos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* no lúmen das regiões antral e dorsal do estômago, jejuno e íleo, ligados à digestão de compostos não fibrosos. Junto destes, o filo *Bacteroidetes* integra o táxon mais dominante no estômago equino (PERKINS et al., 2012). Sabe-se que a presença e preeminência de populações associadas aos carboidratos rapidamente fermentescíveis produtoras de lactato, como *Lactobacilos spp.* e *Estreptococos spp.,* bem como consumidoras de lactato (de

FOMBELLE et al., 2003) acontecem porque o pH estomacal permite a seleção dos gêneros resistentes à condição do meio (Al JASSIM et al., 2005; JASSIM & ANDREWS, 2009; HUSTED et al., 2010). A efetividade do processo fermentativo estomacal ainda é estudada e devemos considerar fatores cinéticos e físico-químicos, além das particularidades anátomo-fisiológicas da espécie (VAN WEYENBERG et al., 2006).

Seguindo pelo trato gastrointestinal equino, os cavalos foram adaptados para realizar o aproveitamento de substâncias como oligossacarídeos, pectinas, ligações β-glucanas e frutanas, que compõem as frações da parede celular, já que abriga uma vasta e complexa microbiota intestinal. A diversidade microbiana é altamente especializada no aproveitamento destes por meio da produção de celulase e outras enzimas no intestino grosso, e os microrganismos dependem das condições de meio favoráveis para a realização desta função, bem como da interação entre comunidades (HALL, 2003; HOFFMAN, 2009). Vale lembrar que as relações podem ser positivas, de simbiose, ao realizar a digestão de nutrientes que seriam indigeríveis para o cavalo até as relações negativas, de patogenicidade (COSTA & WEESE, 2019).

Um dos reflexos da alta variabilidade na composição das populações microbianas entre os compartimentos do trato gastrointestinal equino, bem como nas amostras de mucosa e lúmen de cada segmento, são os contrastes das características físico-químicas do ambiente (MARTIN et al., 2017; ERICSSON et al., 2016). Quando o equilíbrio físico-químico do ambiente fermentativo é afetado outras funções daquele compartimento podem ser afetadas, como por exemplo, a redução da capacidade de absorção dos AGCC pelo intestino grosso (CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019). Isto acontece pela alteração do pH, composição do alimento e o tempo de retenção da digesta, determinando a ação microbiana em equinos (VAN SOEST, 1995). O uso de técnicas de sequenciamento genômico permitiram observar que, ao fornecer uma dieta rica em concentrados a riqueza e a diversidade nos compartimentos ceco-colônicos foram reduzidas (HANSEN et al., 2015). A redução do pH do meio contribui para as mudanças na estrutura da comunidade microbiana, visto que determinadas faixas de pH favorecem a ação de bactérias adaptadas para seu ponto ótimo de ação (CLARKE et al., 1990; CIPRIANO-SALAZAR et al., 2019). O nível de estabilidade da fermentação está diretamente relacionado às mudanças, principalmente, nos compartimentos finais do intestino grosso (REECE, 2006). A proporção entre o concentrado e o volumoso da dieta somada ao perfil dos carboidratos disponíveis

afetarão o pH, ácidos e gases produzidos e modulação das comunidades microbianas presentes no decorrer do trato gastrointestinal, que serão refletidos nas fezes (MOORE-COLYER et al., 2000).

A modulação das comunidades bacterianas acontece desde o nascimento no cavalo. Foi demonstrado que a comunidade de *Lactobacillus* é estabelecida logo após o nascimento dos potros e se altera em proporções ao longo da vida, e que *Firmicutes* representa um dos filos predominantes neste momento (ALMEIDA et al., 2016). Porém, alterações nas proporções são percebidas desde o segundo dia de vida, onde filos como *Verrucomicrobia* passam a se manifestar mais ativamente. Esta dinâmica de populações atinge algum grau de estabilidade aos 60 dias de vida do potro e, mais intensamente aos 9 meses de vida (COSTA et al., 2015). Quanto a atividade fermentativa, foi demonstrado que a presença de determinadas espécies pode inibir ou estimular a presença de outras. A colonização por *Lactobcilli indigenous* no estômago de ratos regulam a colonização por outras espécies e, consequentemente, sua ação (MOROTOMI et al., 1975; WATANABE et al., 1977; YUKI et al., 2000). Foi comprovado que a maior estabilidade das populações residentes no trato gastrointestinal de cavalos é tida quando há maior riqueza e diversidade (JULLIAND & GRIMM, 2017). As disbioses e instabilidades nas interações das comunidades microbianas são vistas comumente ao passo em que dietas baseadas em volumosos são acrescidas de alimentos concentrados (WILLING et al., 2009), o que irá priorizar a colonização e dominância de gêneros como *Lactobacillus spp* e *Streptococcus spp*, essencialmente amilolíticas (HOFFMAN, 2009).

O fornecimento de dietas com composições química e botânica altamente similares, alterando apenas a quantidade fornecida, processamentos ou frequência de fornecimento, não resultou em alteração das comunidades bacterianas (GRIMM et al., 2017). Foi demonstrado que as bactérias utilizadoras de hemicelulose e pectinas realizarão a hidrólise por meio de enzimas específicas, gerando xilose e ácido galacturônico. Destes compostos, a proporção de ácido lático, AGCC e outros gases, serão determinadas de acordo com as espécies utilizadoras dos substratos (JULLIAND & GRIMM, 2017). Por exemplo, a produção de lactato foi atrelada à ação de bactérias como *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus*, entre outras cepas, e a produção de acetato foi observada junto a diferentes cepas de *Ruminococcus* sp, demonstrando a importância da manutenção do meio visando o favorecimento das

cepas desejáveis no metabolismo energético dos cavalos. (JULLIAND et al., 1999; AL JASSIM et al., 2005).

Estimar o perfil da microbiota estomacal e intestinal de equinos considerados saudáveis ainda é um desafio para os pesquisadores, além da influência e diferenciação das comunidades que compõem as frações luminais ou mucosas (ERICSSON et al., 2016). As alterações avaliadas à nível fecal representam as ocorrências nas regiões ceco-colônicas ventrais, e foram demonstradas por resultados distribuídos em gráficos de análise de componentes principais (PCoA), mostrando que as fezes indicam com certa precisão as alterações ocorridas nestes compartimentos (JULLIAND & GRIMM, 2016; GRIMM et al., 2017). A modulação do meio pelas estratégias nutricionais deve ser considerada, onde o fornecimento de alimentos predominantemente compostos por fibras de alta degradabilidade geram precursores energéticos para o cavalo colaborando com o equilíbrio do meio permitindo a ação e proliferação de bactérias essencialmente fibrolíticas (BRANDI & FURTADO, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL

O experimento foi realizado entre os meses de outubro/2020 a fevereiro/2021, no Laboratório de Pesquisa em Saúde Digestiva e Desempenho de Equinos (LabEqui) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP/FMVZ/USP), sob as coordenadas geográficas 21°95'2022S 47°45'2892W, no Campus Administrativo Fernando Costa, Pirassununga, São Paulo.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados oito cavalos da raça Puro Sangue Árabe, machos, castrados, com idade aproximada de 12 anos, peso corpóreo (PC) médio de 439,75 ± 34,89 kg e escore de condição corporal (ECC) médio de 5,72 ± 0,46 na escala (1 a 9) de Henneke et al. (1983). Em cada período experimental os cavalos foram pesados em balança eletrônica, avaliados quanto ao ECC médio inicial e fotografados para controle futuro (Figura 1). Os animais foram considerados hígidos após exame clínico.

Todos os animais foram vermifugados e vacinados contra raiva, influenza, tétano e encefalomielite.

Figura 1. Arquivos das avaliações de escore de condição corporal de cavalos Puro Sangue Árabe submetidos à dieta rica em amido com ou sem a adição de superfibra.

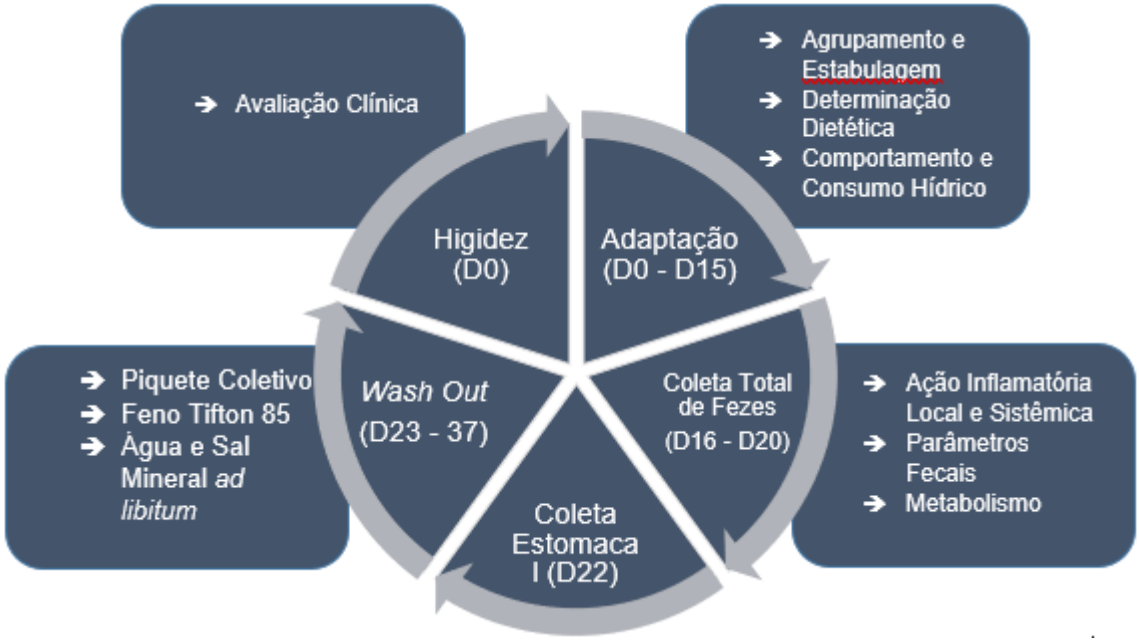
Fonte: PEREIRA, 2022.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS

O experimento foi realizado em quadrado latino duplo 4×4 contemporâneo, o animal representou a unidade experimental dentro de cada período experimental (n = 8 animais por tratamento). Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos, com dois animais por tratamento por período experimental.

O protocolo experimental seguiu 15 dias para a adaptação à dieta e instalações, cinco dias de coleta total de fezes (CTF) e dois dias para a coleta de conteúdo estomacal, resultando em quatro períodos experimentais de 22 dias cada (Figura 2). Entre os períodos experimentais, os grupos foram submetidos a 15 dias de *wash out* em piquete coletivo, recebendo feno Tifton 85 (*Cynodon dactylon* spp.) à vontade, água e sal *ad libitum*, visando minimizar os eventuais efeitos residuais entre os animais.

Figura 2. Fluxograma experimental ilustrando as atividades desenvolvidas em cada etapa dos períodos experimentais e entre os períodos.



Fonte: PEREIRA, 2022.

A dieta basal de referência foi calculada para suprir as exigências diárias de manutenção segundo MARTIN-ROSSET & MARTIN (2015), de 1,75% do PC de cada animal em matéria seca, divididos em 0,70% oriundos do feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon* spp.) e 1,05% de concentrado farelado (Tabela 1). A dieta foi formulada para conter elevado teor de amido, de aproximadamente 4,3 g por 100 kg de PC do cavalo por dia, visando submeter os cavalos a desafio dietético (POTTER et al., 1992). A dieta foi fornecida em duas refeições diárias às 07h00min e 16h00min, com água e sal mineral (Níveis de garantia do sal mineral no Anexo A) ofertados *ad libitum.*

Tabela 1. Formulação do concentrado utilizado nas dietas referência.

INGREDIENTE	INCLUSÃO (%)
Milho Moído	43,0
Farelo de Soja	4,0
Farelo de Trigo	43,0
Sal Comum	1,0
Calcário	2,5
Óleo de Soja	3,5
Núcleo Equinos*	3,0
TOTAL	100,0

*Composição do Núcleo Equinos no Anexo B.
Fonte: PEREIRA, 2022.

No início de cada período experimental a dieta foi fornecida gradativamente durante os primeiros sete dias. Aos dois primeiros dias foram fornecidos 25% da quantidade de concentrado estipulada individualmente, e a cada dois dias houve o aumento progressivo de 25% até que se atingisse a quantidade final proposta. Para respeitar o fornecimento de 1,75% de matéria seca diariamente durante o período de fornecimento gradativo, o equivalente foi fornecido em feno. A pesagem de dos alimentos foi realizada em uma balança digital (Toledo®, modelo M2098/61, d = e = 0,01kg). A composição bromatológica dos componentes da dieta estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Composição bromatológica dos componentes das dietas.

Nutrientes (%)	Feno	Ração
Matéria Seca	89,81	90,27
Matéria Mineral	7,04	9,46
Proteína Bruta	10,19	13,32
Extrato Etéreo	2,20	4,40
FDA	45,55	8,36
FDN	78,77	23,50
Amido	5,87	42,69
Cálcio	0,31	2,10
Fósforo	0,18	0,58
Energia Bruta (kcal/g)	4,36	4,21

Legenda: FDN = Fibra em Detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Ao início do experimento as amostras de feno e concentrado foram coletadas para as análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), extrato etéreo (EE), e matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), cálcio (Ca) e fósforo (P), de acordo a AOAC (2000). A proteína bruta foi obtida a partir do teor de nitrogênio e sua multiplicação pelo fator de correção de 6,25, determinado por regra de três simples, já que o nitrogênio possui 16% do peso da proteína, têm-se em 100g de PB 16g de nitrogênio, obtendo assim o fator de correção.

A fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram obtidas a partir do método de partição de fibras (VAN SOEST et al., 1991). Para determinar os teores de amido foi utilizado método enzimático de Pereira & Rossi Junior (1995). Os carboidratos não fibrosos foram calculados por diferença, de acordo com metodologia adaptada de Hoffman et al. (2001) e Jose-Cunilleras et al. (2004), segundo a equação:

$$CNF\% = 100 - (PB\% + EE\% + MM\% + FDN\%)$$

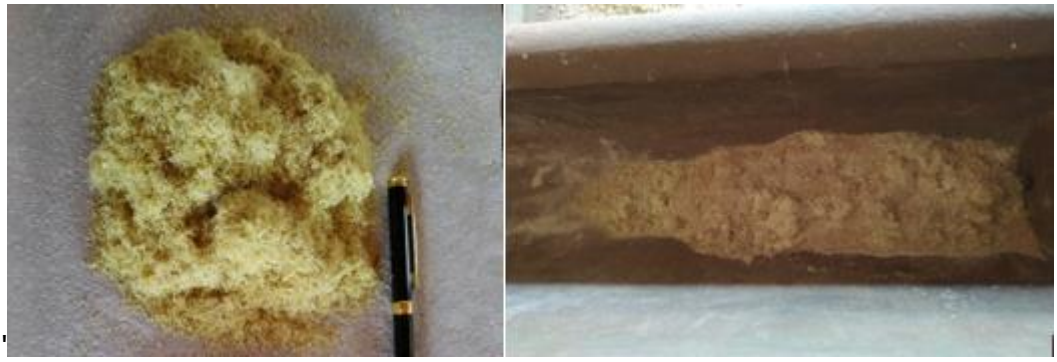
A energia bruta (EB) dos alimentos e nas fezes foi dada pelo método de calorimetria direta, mensurada por Bomba Calorimétrica pela corrente elétrica gerada pelo calor captado por pares termoelétricos (RESENDE et al., 2006). Uma caloria representa a quantidade de energia liberada para aquecer 1 g de água em 1°C (NRC, 2007).

As dietas experimentais foram divididas em:

1) Controle: Dieta basal (DB) de referência, 0 g/Kg de PC animal/dia;
2) P1: Dieta referência + 0,27 g/Kg de PC animal/dia;
3) P2: Dieta referência + 0,57 g/Kg de PC animal/dia;
4) P3: Dieta referência + 0,81 g/Kg de PC animal/dia.

A pectina utilizada compõe uma superfibra (Figura 3), coproduto da indústria de suco de laranja, e foi adicionada à dieta farelada de referência via *top dress*, dividida igualmente conforme as duas refeições diárias. O coproduto é de fácil mistura, porém tem forma física diferente da ração farelada, o que pode ocasionar a formação de grumos.

Figura 3. À esquerda a superfibra utilizada adicionada via top dress no concentrado. À direita a dieta P3 fornecida no cocho.



Fonte: PEREIRA, 2022.

A superfibra fornecedora de pectina foi pesada em balança Semi-Analítica de precisão. A composição bromatológica da superfibra está descrita na Tabela 3 e as características físico-químicas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 3. Composição bromatológica da superfibra.

Nutrientes (%)	Superfibra
Matéria Seca	91,50
Matéria Mineral	3,95
Proteína Bruta	8,05
Extrato Etéreo	0,00
FDA	21,05
FDN	31,00
Pectina	39,30
Energia Bruta (Mcal/Kg MS)	4,02

Legenda: FDN = Fibra em Detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Tabela 4. Características físico-químicas da superfibra.

Viscosidade (cP)	**CRA (g/g)**	**VI (dL/g)**
167,5	26,1	7,3

Legenda: CRA = Capacidade de Retenção de Água; VI = Viscosidade Intrínseca.
Fonte: Dados obtidos pelo fornecedor.

4.4 INSTALAÇÕES E MANEJO

Durante o estudo os animais foram alojados em baias individuais de alvenaria com piso de concreto coberto por maravalha nos períodos de adaptação, contendo cochos de concreto para o fornecimento de água, sal mineral e ração. Redes de feno foram usadas nos cantos superiores das baias para o seu fornecimento. Durante o período adaptativo os cavalos foram soltos diariamente, das 10h00min às 11h00min em piquete coletivo, sem acesso à água ou alimentos, com o intuito de reduzir o estresse do confinamento.

Nos períodos de CTF a maravalha da cama foi retirada e os animais ficaram alojados sob o piso de concreto das baias para garantir o procedimento, retornando o material ao sexto dia para garantir conforto até a realização da coleta estomacal, ao sétimo dia.

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA METABÓLICA PÓS-PRANDIAL

4.5.1 RESPOSTA GLICÊMICA

Ao terceiro dia de CTF, para avaliar a dinâmica da resposta glicêmica pós-prandial, as amostras foram coletadas por venopunção da jugular externa, às 6h30min (antes da primeira refeição diária), e posteriormente a cada uma hora (7h30min, 8h30min, 9h30min e 10h30min) contemplando, ao final, cinco momentos de coleta. As

amostras foram colhidas em tubos Vacutainer BD® com Fluoreto de Sódio como inibidor glicolítico e anticoagulante EDTA, homogeneizados por inversão de 5 a 8 vezes para evitar a hemólise (STULL & RODIEK, 1988).

O processamento das amostras deu-se pela centrifugação em Centrífuga Centribio® (modelo 80-2B-15mL) por 10 minutos a 1800×g. Após, as amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf com capacidade para 1,5mL, em duplicatas, e armazenados a -20°C (RAMALHO et al., 2012; STULL & RODIEK, 1988).

As concentrações de glicose foram determinadas segundo o método de GOD-Trinder por kit comercial Labtest (ref. 133-1; Calibra H ref. 80-1; Qualitrol 1H ref. 71-1), no Laboratório Multiusuário de Ensino, Pesquisa e Extensão em Análises Clínicas Veterinárias (ZMV) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP, Pirassununga, SP) (TRINDER, 1954).

4.5.2 RESPOSTA INSULINÊMICA

Para analisar os níveis de insulina sérica ao longo do tempo, as amostras foram coletadas ao terceiro dia de CTF às 6h30min (antes da primeira refeição diária), 7h30min, 8h30min, 9h30min e 10h30min, em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes via punção da veia jugular externa (STULL & RODIEK, 1988).

O processamento das amostras seguiu a centrifugação em Centrífuga Centribio® (modelo 80-2B-15mL) por 10 minutos a 1800×g. As amostras foram armazenas a -20°C, em tubos eppendorf 1,5mL em duplicatas para posterior leitura (RAMALHO et al., 2012; STULL & RODIEK, 1988).

As concentrações de insulina foram determinadas no laboratório DAC Diagnósticos Análises Clínicas, Pirassununga, SP, pelo método de quimioluminescência (CARSLAKE et al., 2017).

4.6 METABOLISMO LIPÍDICO

Para a avaliação do metabolismo lipídico foram determinados triglicérides, colesterol e suas frações (HDL, LDL e VLDL). As amostras foram coletadas ao terceiro dia de CTF, por punção da veia jugular externa, antes da primeira refeição diária às 6h30min (MARCHELLO et al., 2000).

Após a coleta as amostras ficaram em descanso por 30 minutos, posteriormente centrifugadas no equipamento Centribio (modelo 80-2B-15mL) a 1800×g, onde o soro foi acondicionado em tubos eppendorf 1,5mL, em duplicatas congeladas a -20°C. O metabolismo lipídico foi baseado no uso de kits comerciais (Labtest, Brasil). O colesterol plasmático foi analisado segundo o método calorimétrico-enzimático de Trinder (Colesterol ref. 76-2) (TRINDER, 1954). Os níveis de triglicérides foram dosados segundo o método calorimétrico por Reação de Trinder (Triglicérides ref. 87-2/100) (TRINDER, 1969). Para as dosagens de HDL (método surfactante seletivo), LDL e VLDL foi aplicada a Equação de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972) onde:

$$LDL = CT - HDL - VLDL, \text{ onde:}$$

CT = Colesterol Total;

VLDL = Triglicérides/5

O procedimento ocorreu no Laboratório Multiusuário de Ensino, Pesquisa e Extensão em Análises Clínicas Veterinárias (ZMV) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP, Pirassununga, SP).

4.7 ANÁLISE DA RESPOSTA FERMENTATIVA ESTOMACAL

Ao sétimo dia dos períodos experimentais ocorreram as coletas estomacais. Para tal, no dia do procedimento os cavalos foram privados do consumo de volumoso, que poderia entupir a passagem da sonda usada para coletar as amostras. Os cavalos foram divididos em blocos, a partir das 6h00min, para garantir um intervalo máximo de 1h30min entre o início da alimentação, sedação e a coleta (adaptado de VARLOUD et al., 2007).

A sedação foi realizada por via intravenosa com Detomidina (Dettovet®, JA Saúde Animal, SP, Brasil), na dose de 0,1 mg/kg do equino. A sonda nasogástrica (PVC, 2,85m de comprimento, 15mm de diâmetro interno e 19mm de diâmetro externo) foi inserida em uma das narinas para atingir o esôfago. Um vídeoendoscópio flexível (3 m de comprimento, 10,8 mm de diâmetro) foi introduzido na narina contralateral, guiada em movimento sincronizado com a sonda nasogástrica até o contato com a digesta e a identificação da *margo plicatus*. Os materiais foram previamente lubrificados com gel (DELFINE, 1999). Após a identificação da região de coleta o conteúdo foi aspirado para um recipiente de vidro (Figura 4).

Figura 4. Cavalo submetido a passagem de sonda nasogástrica e endoscópio para auxílio à localização da região de coleta do conteúdo estomacal.

Fonte: PEREIRA, 2022.

4.7.1 ÁCIDO LÁTICO

Inicialmente as amostras estomacais foram armazenadas em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes imediatamente após a coleta e homogeneização do conteúdo obtido, na quantidade de 10 mL, em duplicatas. Os tubos foram devidamente identificados e separados em amostras “A” e “B”, e congelados a -20°C (PRYCE, 1969).

As amostras foram manipuladas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia (VNP/FMVZ/USP, Pirassununga, SP) e analisadas segundo Pryce (1969). Após o descongelamento das amostras, 3,9 mL de reagente precipitante foram transferidos para tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes, junto a 0,1 mL de amostra em triplicatas. Em seguida, os tubos foram agitados em Vórtex (velocidade intermediária) por três minutos, e então centrifugados a 2000 rpm. Foi utilizado um composto de solução padrão Ácido Lático 0,08% e NaOH (PRYCE, 1969).

Em seguida, 1 mL do sobrenadante amostral foi transferido para tubo de ensaio somado a adição de 6 mL de Ácido Sulfúrico (H2SO4) 96% P.A. A solução foi aquecida em banho-maria na faixa de 70-80°C por três minutos, e esfriada em água corrente até atingir temperatura ambiente. Na sequência, 0,1 mL do “Reagente de Cor” foi adicionado à amostra, reagiu por 10 minutos e foi levado novamente a banho-maria por 90 segundos em água fervente. Após atingir temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à leitura em absorbância em espectofotômetro a 565 nm (respeitando a faixa de 500 a 570 nm) previamente calibrado com solução branco reagente (PRYCE, 1969).

4.7.2 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

Para determinar a concentração de AGCC (acético, butírico, propiônico, isobutírico, isovalérico e valérico) 4 mL do conteúdo gástrico foram transferidos imediatamente após a coleta para tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante, contendo previamente 1 mL de ácido fórmico PA grau HPLC 98-100%. Em seguida, os tubos foram centrifugados (Centribio®, modelo 80-2B-15mL) por 12 minutos a 4.000 rpm, permitindo a separação do sobrenadante em tubos eppendorf 1,5 mL, em duplicata, congelados a -20°C (FERREIRA et al., 2016).

A análise foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa Agilent 7890A, equipada com um detector de ionização da chama (7683B) e uma coluna capilar fundida em sílica (J&W19091F-112) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), segundo Ferreira et al. (2016), no Laboratório de Bromatologia (EsalqLab) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

4.7.3 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH do conteúdo estomacal foi avaliado imediatamente após a coleta. O auxílio do videoendoscópio permitiu que a coleta fosse realizada na região aglandular estomacal, pela visualização da *margo plicatus.* A amostra foi transferida em 10 mL para tubos de ensaio para facilitar o processamento, o qual ocorreu por meio de um pHmetro de bancada digital Quimis®, com a inserção do eletrodo diretamente na amostra para a leitura do pH (JOUANY, 1982).

4.8 AMOSTRAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RNA - MICROBIOMA

4.8.1 AMOSTRAS ESTOMACAIS E FECAIS

Seguindo o método adaptado de Varloud et al. (2007), as amostras estomacais foram coletadas ao sétimo dia de cada período experimental foram imediatamente transferidas após cada coleta para tubos Falcon 50 mL, garantindo a presença da fração líquida e partículas de alimento recuperadas da aspiração, após homogeneização. Os tubos foram congelados em Ultrafreezer sob temperatura de -80°C.

As amostras fecais foram colhidas ao quinto dia de CTF, em tubos Falcon 50mL, imediatamente após a defecação sucessiva a primeira alimentação diária. Foram utilizadas luvas livres de pó, trocadas a cada amostra para evitar a contaminação cruzada. Foram priorizadas as frações sem contato com o ar ou piso das baias, com o intuito de evitar a contaminação da amostra. As amostras foram levadas para congelamento em Ultrafreezer a -80°C (VARLOUD et al., 2007).

Para a extração do DNA foi empregado o Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit (Zymo Research), segundo recomendações do fabricante. A região V4 do gene 16S RNAr foi amplificada por reações de PCR (volume final 20µL) contendo 10µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3µL de oligonucleotídeo *foward* e 0,3µL de oligonucléotídeo *reverse,* 1µL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20 µL.Os primers usados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos foward e reverse, utilizados na amplificação de DNA.

Iniciador	Sequência 5' – 3'
16S V4 *foward*	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16S V4 *reverse*	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT

Fonte: PEREIRA, 2022.

As reações foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Em seguida, a amplificação foi comprovada em Eletroforese em Gel de Agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v). Os produtos (amplicons ~ 400bp) foram purificados utilizando *bead* magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), de acordo com o protocolo do fabricante. A Reação de Indexação ocorreu inserindo os indexadores nos adaptadores comuns, necessários para a geração de

clusters e sequenciamento das amostras. O procedimento seguiu o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina) e amplificação em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

A purificação das bibliotecas geradas ocorreu pela pelo uso de *bead* magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), para remover os fragmentos pequenos da população total de moléculas e resquícios de *primers*. A quantificação seguiu metodologia de PCR em tempo real por KAPPA-KK4824 (Library Quantification Kit – Illumina/Universal) no equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante.

Um *pool* equimolar de DNA foi gerado, através da normalização de todas as amostras a 4nM para a realização do sequenciamento, conduzido pelo sistema Illumina MiniSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiniSeq Reagent MID 300 ciclos – leitura de 2×150bp.

Os *reads* obtidos foram agrupados em ASV's (*Amplicon Sequence Variant*), sendo estas OTU's com 100% de similaridade. As métricas de diversidade α, diversidade β e Análises de Coordenadas Principais (PCoA) foram estimadas pela diversidade "q2", após processamento por 40.607 sequências por amostra, onde foram identificados aproximadamente 14 filos e 118 gêneros.

4.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FERMENTATIVA FECAL

4.9.1 ESCORE DE FEZES

O escore de fezes foi avaliado no quarto dia de CTF, colhidas as amostras de síbalas íntegras da defecação após a primeira refeição diária, com luvas livres de pó, sem que houvesse modificação da estrutura do conteúdo fecal. Os montantes foram posicionados em folhas sulfite sob fonte de luz constante para reduzir as variações na avaliação de coloração (Figura 5). As folhas foram identificadas com o nome do animal, escore de cor (1-5) e consistência (1-5) indicados pelo avaliador previamente treinado, seguindo o método adaptado de Gonçalves et al. (2006) e Godoi et al. (2009).

Figura 5. Amostras fecais contendo síbalas íntegras em fundo branco para a avaliação do escore de fezes quanto a cor e consistência.

Fonte: PEREIRA, 2022.

A variação da coloração seguiu uma escala de 1 a 5, onde o escore 1 indicou coloração verde amarelado ao verde extremamente escurecido. Para avaliar a consistência na escala de 1 a 5, as fezes foram esfareladas e classificadas de acordo com a facilidade de desmanche esfarelando facilmente ou diarréica (escore 1) a fibrosa ou rígida (escore 5). Além disso, informações adicionais pertinentes à amostra foram tomadas como observação.

4.9.2 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

A amostra fecal foi coletada ao segundo dia de CTF, imediatamente após a primeira defecação após a primeira alimentação diária. Como amostra, 2 g de fezes foram imediatamente acondicionados em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes, armazenados a -20°C, em duplicatas (PRYCE, 1969).

No Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia (VNP/FMVZ/USP, Pirassununga, SP), as amostras foram manipuladas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia (VNP/FMVZ/USP, Pirassununga, SP) e analisadas segundo Pryce (1969). Após o descongelamento das amostras, 3,9 mL de reagente precipitante foram transferidos para tubos Vacutainer BD® sem

anticoagulantes, junto a 0,1 mL de amostra em triplicatas. Em seguida, os tubos foram agitados em Vórtex (velocidade intermediária) por três minutos, e então centrifugados a 2000rpm. Foi utilizado um composto de solução padrão Ácido Lático 0,08% e NaOH (PRYCE, 1969).

Em seguida, 1 mL do sobrenadante amostral foi transferido para tubo de ensaio somado a adição de 6 mL de Ácido Sulfúrico (H2SO4) 96% P.A. A solução foi aquecida em banho-maria na faixa de 70-80°C por três minutos, e esfriada em água corrente até atingir temperatura ambiente. Na sequência, 0,1 mL do “Reagente de Cor” foi adicionado à amostra, reagiu por 10 minutos e foi levado novamente a banho-maria por 90 segundos em água fervente. Após atingir temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à leitura em absorbância em espectofotômetro a 565 nm (respeitando a faixa de 500 a 570 nm) previamente calibrado com solução branco reagente (PRYCE, 1969).

4.9.3 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NAS FEZES

Para determinar os AGCC nas fezes, as amostras foram coletadas no segundo dia de CTF em tubos Falcon 50 mL, com o intuito de evitar a volatilização dos ácidos do momento da coleta até a condução para o laboratório de preparação das amostras. Até o processamento as amostras foram refrigeradas. A diluição deu-se na proporção de 2:1, ou seja, 20 mL de água destilada para 10 g de fezes, o material foi homogeneizado e coado em panos porosos em béqueres com capacidade de 200 mL (FERREIRA et al., 2016).

A fração líquida da amostra coada foi transferida para tubos Vacutainer BD® sem anticoagulantes, contendo previamente 4 mL de Ácido Fórmico PA grau HPLC-98-100%, centrifugados por 12 minutos a 4.000 rpm em centrífuga Centribio® (modelo 80-2B-15mL). O sobrenadante, em seguida, foi transferido para tubos eppendorf 1,5 mL em duplicatas e armazenados a -20°C (FERREIRA et al., 2016).

A análise foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa Agilent 7890A, equipada com um detector de ionização da chama (7683B) e uma coluna capilar fundida em sílica (J&W19091F-112) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), segundo Ferreira et al. (2016), no Laboratório de Bromatologia (EsalqLab) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

4.9.4 DETERMINAÇÃO DO pH FECAL

O pH fecal foi aferido no segundo dia de CTF, representando um indicador das alterações no trato gastrointestinal do excesso de carboidratos não estruturais que poderiam atingir o intestino grosso. As amostras foram coletadas no momento da defecação seguinte a primeira refeição diária de cada cavalo, utilizando luvas livres de pó e béqueres com capacidade de 200 mL previamente higienizados (ZEYNER et al., 2004; GOACHET et al., 2014).

O conteúdo coletado sólido passou por processamento visando a diluição da amostra, que foi realizada na proporção de 1:1, onde 20 g de água destilada para 20 g de fezes pesadas em balança semi analítica de precisão. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado e coado em béqueres com capacidade para 200 mL, tecidos porosos como filtro e transferidos para tubos de ensaio 10 mL. Assim, o eletrodo do peagâmetro de bancada digital Quimis® foi inserido até que fosse estabilizada a leitura (JOUANY, 1982).

4.9.5 COLETA TOTAL DE FEZES

As amostras fecais para a realização do ensaio de digestibilidade aparente foram coletadas pelo método de CTF. Durante cinco dias as fezes foram coletadas diretamente do piso das baias com o auxílio de pás e vassouras, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados. Durante os períodos experimentais, os sacos contendo amostras foram substituídos a cada 12 horas, pesados, homogeneizados e retiradas alíquotas de 10% para identificação e armazenamento em freezer -20°C. Ao final de cada período experimental, as amostras foram unidas para formar amostras compostas.

A matéria seca das fezes foi determinada pela pesagem das amostras compostas descongeladas, em temperatura ambiente, seguido de secagem em estufa de ventilação forçada a 65°C, pesadas em condição natural e por 64 horas, até atingir peso constante. Em seguida, as amostras passaram por moinho de facas compostas por peneiras de 1 mm e acondicionadas em tubos de vidro, preparadas para as avaliações seguintes.

4.9.6 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS NUTRIENTES DA DIETA

Assim, os Coeficientes de Digestibilidade dos Nutrientes da Dieta (CD) foram calculados subtraindo a quantidade do nutriente no alimento fornecido da quantidade do nutriente nas fezes, sendo:

$$CD(\%) = \frac{(Ni - Ne)}{Ne} x100, \text{ onde:}$$

CD (%) = Coeficiente de Digestibilidade;

Ni = Nutriente ingerido em gramas (g);

Ne = Nutriente excretado em gramas (g).

4.10 MARCADORES INFLAMATÓRIOS LOCAIS E SISTÊMICOS

4.10.1 ULTRASSONOGRAFIA TRANSABDOMINAL

O exame ultrassonográfico via transabdominal foi realizado no quinto dia de CTF, às 9h00min. Foi realizada uma tricotomia na lateral direita do costado abrangendo o décimo quinto espaço intercostal até o flanco do cavalo, permitindo avaliar o cólon dorsal direito. O mesmo procedimento foi feito na virilha esquerda, para permitir a avaliação das alças intestinais, no cólon menor.

Foi utilizado o aparelho Esaote MyLabTMDelta com o auxílio de uma probe microconvexa. A varredura ocorreu segundo a técnica descrita por Siwinska et al. (2017), para capturar as imagens. Os arquivos multimídia e nativos foram salvos em HD externo, permitindo avaliação posterior. As imagens foram visualizadas pelo software MyLabTM Desk3 por Médica Veterinária devidamente treinada. A mensuração foi feita a partir da serosa até a submucosa da imagem estática de melhor qualidade obtida, em três pontos distintos (Figura 7) para a obtenção do valor médio de espessura.

Figura 6. Imagem da avaliação ultrassonográfica transabdominal de equinos para a mensuração da espessura de parede intestinal. À esquerda avaliação das alças de cólon menor, e à direita de cólon dorsal direito.

Fonte: PEREIRA, 2022.

4.10.2 FIBRINOGÊNIO PLASMÁTICO

A coleta ocorreu por punção da veia jugular externa em tubos Vacutainer BD® com EDTA, às 9h00min do terceiro dia de CTF. A dosagem da concentração de fibrinogênio plasmática foi realizada pela técnica de precipitação pelo calor a 56°C, por três minutos, e a leitura por refratometria (JAIN, 1993), no Laboratório Multiusuário de Ensino, Pesquisa e Extensão em Análises Clínicas Veterinárias (ZMV, Pirassununga, SP).

4.10.3 QUANTIFICAÇÃO DE IgA FECAL

A coleta de amostras para a quantificação da Imunoglobulina A (IgA) fecal foi realizada no quinto dia de CTF, após a primeira defecação diária do animal seguinte ao fornecimento da primeira refeição, às 07h00min. As amostras foram coletadas em tubos Falcon 50 mL, com o uso de luvas livres de pó e da fração sem contato com o piso da baia ou com o ar.

A preparação da amostra seguiu pela pesagem de aproximadamente 1,0 g de fezes em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) de pH 7,4, em tubos Vacutainer BD® sem anticoagulante. A mistura foi levada a um agitador Vortex (modelo TV-QUIMIS) em velocidade três por três minutos, seguido de 15 minutos de descanso da amostra. Em sequência, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 1600×g, na velocidade

dois da centrífuga Centribio® Após, 800 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos com capacidade para 1,5 mL, o qual foram novamente centrifugados a 3060×g, por 15 minutos na velocidade quatro (Centribio®), retirando o sobrenadante na quantidade de 500 µL para um novo microtubo de 1,5 mL e congelando-os a -20°C.

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Neuroimunomodulação da FMVZ/USP, São Paulo, SP. A leitura foi realizada através do ensaio de Imunoperoxidase pelo Horse IgA ELISA Quantitation Set, através do Horse IgA ELISA Quantitation Set (cód. E70-116, Bethyl Laboratories, Inc.) (NUNN, 2006).

4.11 COMPORTAMENTO

A aceitabilidade foi avaliada previamente a execução do experimento. Para tal, os cavalos foram avaliados em central de alimentação do tipo “lanchonete”, individualmente, por três dias em duas refeições diárias. Durante o manejo alimentar de rotina, a Superfibra foi adicionada na quantidade de 180g/animal/refeição sobre 1 kg de concentrado/animal/dia, segundo recomendações de manutenção do NRC (2007), para avaliar a reação ao novo pelos cavalos. A avaliação foi realizada em dois espaços: 1) área comum da central de alimentação “curral”; 2) boxes individuais da lanchonete, como descrito na Tabela 6. O tempo de consumo foi avaliado em cada refeição e o tempo de permanência máximo foi de 30 minutos por cavalo na lanchonete, se extrapolado a manifestação foi avaliada quanto a inexistência de consumo, consumiu e parou ou consumo intermitente.

Tabela 6. Etograma para a avaliação de aceitabilidade (frequência) e tempo de consumo (minutos).

Local ou Momento de Avaliação	Manifestação Comportamental
Área Comum (“curral”): Fora dos boxes de Alimentação	Não acessou o box individual Recusa parcial/momentânea para acessar o box Entrada definitiva
Dentro dos boxes individuais	Acessou o box, mas recusou o cocho Acessou o cocho, mas não consumiu o alimento, cheirou, “fuçou” Acessou e consumiu prontamente o alimento
Durante o Consumo no Cocho	Consumiu e parou (existência de sobras) Consumo Intermitente (seleção de alimentos) Consumo contínuo

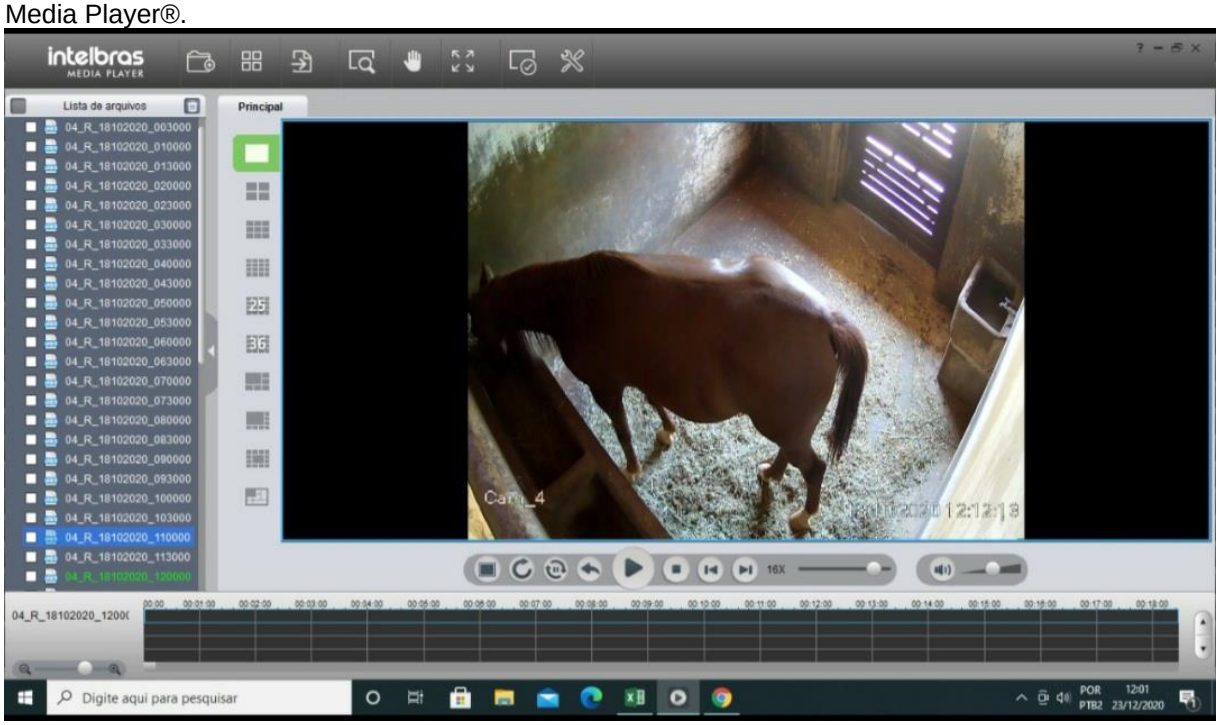
Fonte: PEREIRA, 2022.

No 14° dia de adaptação, o consumo hídrico foi mensurado usando um balde plástico graduado (20 L de capacidade) pelo período de 24 horas. A quantidade foi

padronizada às 06h00min e as avaliações de consumo ocorreram a cada 12 horas, repetindo a padronização da quantidade de água no momento de avaliação. Os bebedouros foram completados com água até o limite e o fornecimento foi registrado individualmente, contabilizando a sobra de água no final do período de avaliação, obtendo por diferença a estimativa do consumo de água (MARTIN-ROSSET, 2015).

No último dia de cada período adaptativo os cavalos foram filmados por câmeras (Intelbras modelo VIP S3230), como na Figura 8, instaladas nos cantos superiores das baias por 24 horas, onde as filmagens representaram as amostras para análise comportamental contínua. Por meio de um software de execução (Intelbras Media Player®), os vídeos foram analisados a cada cinco minutos para a tomada de dados (CANAL JUNIOR, 2015), utilizando etograma comportamental adaptado de Heleski et al. (2002). Durante os dois períodos de arraçoamento, às 7h00min e às 16h00min, o tempo de consumo do concentrado foi contabilizado por meio das filmagens.

Figura 7. Reprodução da tela de análise de dados comportamentais em baias, no software Intelbras Media Player®.



Fonte: PEREIRA, 2022.

Durante a hora de soltura em pista de areia, os animais foram avaliados de forma instantânea com os dados tomados a cada dois minutos. Dois avaliadores previamente treinados fizeram a observação do mesmo grupo de cavalos em todas as datas de coleta de dados. As observações foram descritas diretamente por meio de

etograma, onde as categorias comportamentais foram classificadas de acordo com a Tabela 7, adaptado de Heleski et al., (2002).

Tabela 7. Descrição dos comportamentos possíveis observados nos etogramas usados nestas avaliações.

Manifestações Comportamentais	Descrição
Água	Ingestão de água;
Alimentação	Ingestão de ração ou feno;
Busca por Alimento	Procura por alimento no cocho, rede de feno ou piso da baia, movimentos de lambedura no cocho vazio;
Defecando	Eliminando fezes;
Estereotipias	Movimentos repetidos sem função aparente como passo de urso, balançar a cabeça, aerofagia, roer madeira ou *pacing;*
Interação Negativa	Disputas hierárquicas, brigas, fuga do contato ou reação negativa com o animal da baia vizinha;
Interação Positiva	*Grooming,* mordiscar, aproximação, brincadeiras ou comunicação com animal da baia vizinha;
Ócio	Parado, em posição alerta (orelhas e para cima), posição de descanso em pé ou deitado, posição relaxada (orelhas e pescoço para baixo), dormindo;
Outros	Comportamentos não descritos;
Self-Grooming	Realizando atividades de mordiscar ou lamber a si mesmo, espojar, coçar ou rolar;
Urinando	Eliminando urina;

Fonte: PEREIRA, 2022. Adaptado de
CAANITZ et al., 1991;
FERREIRA, 2020.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) através do pacote MIXED do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.4. Foi considerado o efeito fixo de tratamento, e os efeitos aleatórios de período, animal dentro de cada quadrado e o resíduo. Em seguida as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, considerando uma tendência quando entre 5 e 10% de significância. Quando apresentaram significância pelo teste de Tukey os dados foram submetidos à análise de regressão linear e cúbica.

Para a concentração de IgA fecal, além da avaliação por meio do teste de Tukey, os dados foram submetidos ao contraste ortogonal em relação aos teores de inclusão de tratamento (CON *versus* P1+P2+P3; CON *versus* P3; P1 *versus* P2+P3; P2 *versus* P3), e as estimativas dos contrastes calculadas pela soma das médias das dietas com teores de inclusão subtraindo-se 3 vezes a média da dieta controle.

Para o processamento das análises microbianas foi utilizado o software QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, v. 2021.4). A taxonomia foi feita pelo classificador de características “q2”, classificador de taxonomia de “Bayes naïve classify-sklearn” contra o “Greengenes 13_8”. Para as métricas de diversidade alfa foi utilizada a métrica de Faith (1992) e Pielou Eveness, que considera a árvore filogenética do microbioma das amostras. Para as métricas de diversidade beta foram utilizados o UniFrac ponderado, UniFrac não ponderado, distância de Jaccard e dissimilaridade de Bray-Curtis. Para explorar as diferenças nas métricas de alfa diversidade foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. A beta diversidade testou a distância entre as amostras pela *Permanova* aos pares para dados absolutos e relativos. A análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi estimada por diversidade “q2”.

5 RESUTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

O peso corpóreo (PC) e o escore de condição corporal (ECC) estão descritos na Tabela 8. Mesmo com a suplementação de pectina não foi possível observar diferença sobre o PC (P = 0,7933) e ECC (P = 0,2752).

Tabela 8. Peso corpóreo (kg) e escore de condição corporal de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação de diferentes teores de inclusão de pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
PC (Kg)	429,75±34,75	431,25±37,67	431,44±44,04	429,94±41,86	0,7933
ECC (1-9)	6,25±0,53	6,06±0,49	6,37±0,91	6,31±0,59	0,2752

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Ainda que com a suplementação com pectina neste estudo fosse observada uma diferença entre os teores de energia bruta (EB), a deposição de gordura nos tecidos depende de muitas variáveis, dentre elas o fator individual e a variabilidade dos pontos de avaliação do ECC (MOTTET et al., 2009; GEOR et al., 2013). Porém, se bem aplicada a técnica é suficiente para indicar a ocorrência de alguns distúrbios metabólicos (CARTER et al., 2007). Os resultados apresentados provavelmente têm alguma relação com o período experimental. Em 150 dias de avaliação, o uso de uma

dieta hipercalórica em cavalos da raça Mangalarga Marchador indicou que são necessários pelo menos 75 dias para que haja uma diferença no PC e ECC dos cavalos induzidos por estas dietas (RIBEIRO et al., 2020), o que pode indicar que os 20 dias para cada um dos períodos experimentais foram insuficientes para causar um aumento ou diminuição sobre o PC e o ECC.

5.2 RESPOSTA METABÓLICA PÓS-PRANDIAL

As curvas glicêmica (Tabela 9) e insulinêmica (Tabela 10) pós-prandiais estão descritos por tempo de coleta.

Tabela 9. Concentração de glicose plasmática (mg/dL.h-1) de equinos alimentados com dieta concentrada alto amido (4,3g de amido/100Kg PV) e suplementados com fonte de pectina avaliados em diferentes tempos (minutos).

Variável	Grupo	Tempos de Coleta				
		0	**1**	**2**	**3**	**4**
Glicose	**Controle**	91,54±6,06	93,18±3,97	98,75±9,22	94,54±9,10	96,06±10,73
	P1	90,79±4,26	95,50±9,39	98,31±17,08	97,88±19,18	97,93±18,40
	P2	91,79±4,64	96,90±8,92	99,54±17,14	96,48±13,07	96,93±8,74
	P3	91,10±5,42	99,25±10,02	103,06±13,75	96,41±9,41	95,18±9,10

Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Tabela 10. Concentração de insulina (mg/dL.h-1) de equinos alimentados com dieta concentrada alto amido (4,3g de amido/100Kg PV) e suplementados com fonte de pectina avaliados em diferentes tempos (minutos).

Variável	Grupo	Tempos de Coleta				
		0	**1**	**2**	**3**	**4**
Insulina	**Controle**	7,73±3,40	41,51±9,57	71,53±15,08	43,26±19,21	48,71±25,26
	P1	9,35±5,69	43,59±19,69	53,76±18,61	41,67±19,87	32,69±17,50
	P2	9,31±6,01	35,74±12,00	75,73±43,29	38,63±23,37	30,22±17,19
	P3	10,55±5,35	49,55±16,34	77,48±33,42	62,70±32,11	40,87±23,99

Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Estes valores médios (mg/dL.h^{-1}) foram utilizados para a elaboração do gráfico de área abaixo da curva (Figura 8 e 9). A concentração de glicose plasmática está descrita na Tabela 11, e não foi possível observar diferença da concentração glicêmica entre os tratamentos propostos (P=0,7850).

Tabela 11. Área abaixo da curva da concentração de glicose plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto teor de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.

Variáveis	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Glicose Plasmática	477,09	470,87	484,42	486,42	0,7850

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

A concentração de insulina plasmática está descrita na Tabela 12. Não foi observada diferença entre a resposta insulinêmica pelos tratamentos (P=0,1084).

Tabela 12. Área abaixo da curva da concentração de insulina plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.

Variáveis	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Insulina Plasmática (mg/dL)	237,93	161,59	180,12	249,84	0,1084

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

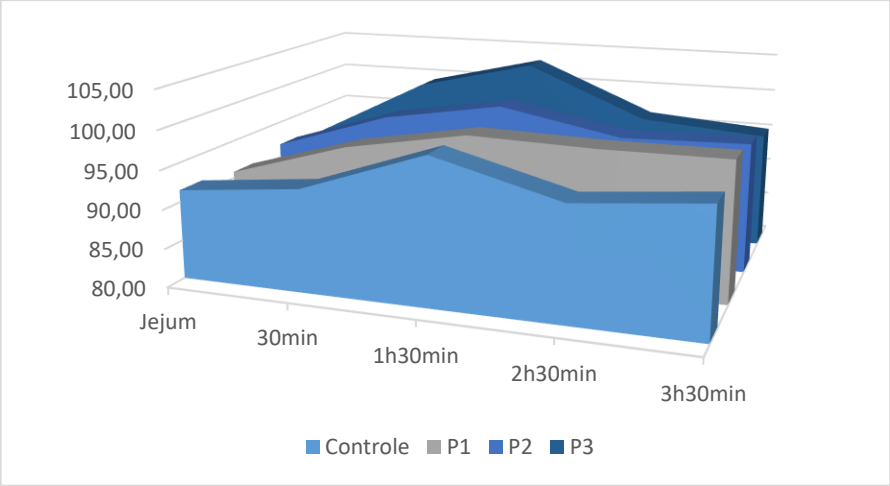
Os resultados apresentados são semelhantes aos de Vervuert et al. (2009), que ao usar uma dieta a base de milho (2 g de amido.kg^{-1} de PC) com lignocelulose purificada (0,2 g.kg^{-1} de PC) ou com pectina (0,1 g.kg^{-1} de PC), não observaram influência sobre a concentração glicêmica ou insulinêmica dos compostos adicionados à dieta. Um estudo testando a adição de polpa de beterraba à dieta para cavalos apontou a digestão de 15% dos polissacarídeos não-amiláceos ocorrendo à nível de intestino delgado (MOORE-COLYER et al., 2000), o que pode ajudar a entender os resultados aqui obtidos.

Em outros estudos foi demonstrado que a redução do amido substituído pela polpa de beterraba sacarina reduz a velocidade para atingir o pico de concentração glicêmica, a concentração (mg/dL) máxima atingida e a resposta de insulina em concentrações gerais ao longo do tempo (mg/dL.h^{-1}) (LINDBERG & KARLSSON, 2001). De acordo com Jensen et al. (2016), dietas ricas em grãos de cevada resultaram em valores de glicose circulante mais altos durante um maior período, quando comparado a dietas baseadas em polpa de beterraba, feno ou sua combinação. Os autores comprovaram que a combinação de feno a uma dieta de cevada como fonte de amido reduz a resposta insulinêmica ao longo do tempo, e

demonstraram uma distribuição mais homogênea das dietas a base de fibra, com menores flutuações das concentrações de insulina plasmática. Os resultados dos autores reforçam a importância da cinética causada pelos alimentos fornecidos ao cavalo, já que o retardo da fermentação das matrizes energéticas reduz a velocidade de disponibilização da glicose na corrente sanguínea e, consequentemente, a resposta insulinêmica.

Por mais que os resultados deste estudo não indiquem, pela comparação de médias, uma diferença significativa entre as respostas, o comportamento gráfico para o tratamento P1 deste, indicou menores flutuações ao longo do tempo para a glicemia (Figura 8).

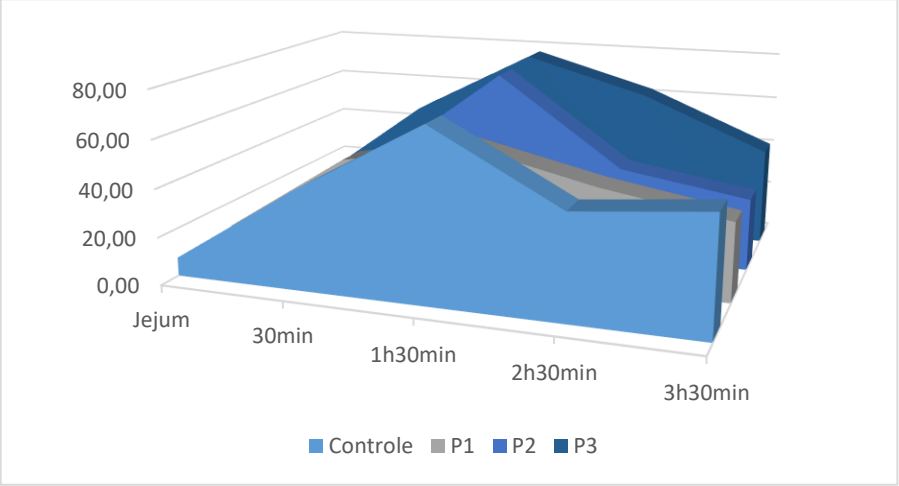
Figura 8. Área abaixo da curva da concentração de glicose plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.



Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

A concentração máxima glicêmica foi atingida aproximadamente 1,5 horas após o fornecimento da ração, diferente do que foi encontrado por autores onde o pico se deu em uma hora após a alimentação (BRØKNER et al., 2016). Contudo, a eficiência de recuperação para os índices de glicose e insulina foi melhor, obtida em duas horas após a alimentação, por outros autores, em dietas baseadas em grãos de cereais ou ração açucarada adicionadas de fibras altamente fermentescíveis, como a polpa de beterraba (VERVUERT et al., 2009).

Figura 9. Área abaixo da curva da concentração de insulina plasmática (mg/dL) de cavalos submetidos à dieta com alto nível de amido e suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.



Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Semelhante ao tempo aqui relatado, a insulina atingiu a concentração máxima em 1,5 horas quando uma dieta à base de gordura foi fornecida contra dietas à base de amido e superfibra (CRANDELL et al., 1999) e duas horas pós-prandial quando utilizada a polpa de beterraba substituindo a aveia (LINDBERG & KARLSSON, 2001).

Já para o metabolismo lipídico não foram observadas alterações nas concentrações de triglicérides e colesterol, e na ação das lipoproteínas HDL, LDL e VLDL entre os tratamentos. Os resultados foram apontados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentração de triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (mg/dL)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Triglicérides	14,65±6,09	15,10±5,21	15,5±4,80	14,3±2,35	0,8554
Colesterol	79,36±9,48	72,65±21,60	74,76±14,93	77,73±4,10	0,7227
HDL	48,47±5,87	48,27±5,16	48,33±3,81	48,65±2,39	0,9219
LDL	26,63±4,88	29,21±6,50	27,17±8,90	26,33±3,95	0,3445
VLDL	3,00±1,30	3,00±1,07	3,00±0,93	2,75±0,46	0,8250

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

As concentrações mínima e máxima de triglicérides se mantiveram entre 14,30mg/dL e 15,50mg/dL, concentrações similares ao resultado encontrado por Terptstry et al. (2000) após o fornecimento de uma dieta contendo polpa de beterraba

desidratada para os cavalos. Os autores observaram que os cavalos que receberam a polpa de beterraba apresentaram uma variação praticamente nula das concentrações de triglicerídeos, em torno de 14,88mg/dL.h^{-1} durante seis horas de avaliação. Já os cavalos que receberam dieta de glicose, a variação atingiu concentrações mínima e máxima de, respectivamente, 11,38mg/dL.h^{-1} até 18,38mg/dL.h^{-1}. Alguma ação da pectina como mediadora da estabilidade das respostas de triglicérides neste estudo é incerta, já que este mecanismo se dá pela ação da lipoproteína lipase, que reduziria a concentração de triglicérides no plasma e aumentaria a ação da VLDL, a qual se manteve estável sob todos os teores de inclusão da pectina, entre 2,75mg/dL.h^{-1} e 3,00mg/dL.h^{-1}.

O comportamento das proteínas transportadoras observado neste estudo era esperado. Um dos fatores que influenciam a dinâmica das proteínas envolvidas na deposição de gordura é o substrato dietético. Neste caso, em que as dietas do estudo apresentavam um ligeiro aumento dos valores energéticos conforme a inclusão de superfibra, o fígado trabalharia em prol de depositar os excessos em forma de glicogênio ou gordura corpórea (STOCKHAM, 1995; GEELEN et al., 2001a; MCKENZIE, 2011), esta última que não foi comprovada pelos resultados demonstrados anteriormente de ECC. Além disso, um aumento da atividade de LDL e VLDL seria notado, consequentemente reduzindo as concentrações de HDL. Pelos resultados já demonstrados, a estabilidade do peso e do ECC dos cavalos podem indicar que a adição da pectina não causou uma alteração na dinâmica das lipoproteínas transportadoras.

5.3 RESPOSTA FERMENTATIVA ESTOMACAL

5.3.1 DINÂMICA BACTERIANA E INDICADORES FÍSICO-QUÍMICOS

Dentre as amostras estomacais, todas atingiram uma média de rarefação superior a 90%, indicando uma boa cobertura do gene 16S RNA das regiões V3 e V4, e estabilidade das sequências analisadas, ou seja, a quantidade de sequências obtidas foi suficiente para demonstrar a diversidade em cada amostra, refletida em ASV's (*Amplicon Sequence Variant)* ao nível de 99% de similaridade. A taxonomia das amostras estomacais permitiu alocar 99,99% das sequências a nível de filo, 99,98% em classe, 99,96% em ordem, 94,47% em família, 80,90% em gênero e 9,54% em espécies.

Sabe-se que a região luminal do estômago apresenta menores contagens totais de indivíduos quando comparado aos demais compartimentos do trato gastrintestinal equino, bem como possibilita menos agrupamentos destes indivíduos em ASV's ou OTU's, o que pode explicar a baixa dissimilaridade aqui obtida. A alta variabilidade das comunidades bacterianas luminais demonstradas desde o estômago passando por duodeno e jejuno até atingir o íleo, foi observada neste estudo à nível estomacal e possivelmente influenciada por uma maior taxa de passagem da digesta (ERICSSON et al., 2016). Além disso, a condição ácida do meio pela secreção de ácidos hidroclorídricos somada aos ácidos resultantes da fermentação, baixa produção de saliva e baixa capacidade tamponante no ambiente gástrico (YUKI et al., 2000), podem ter gerado um ambiente desafiador para bactérias essencialmente fibrolíticas, reduzindo a estabilidade das comunidades locais.

A alfa diversidade pelo teste de *Kruskal-Wallis* utilizando as métricas *Faith_PD* (P>0,05) e *Eveness* (P>0,05), não permitiram observar diferenças entre os tratamentos pela comparação aos pares. Os resultados para a beta diversidade também não indicaram diferença quanto aos dados relativos ou absolutos (P>0,05).

A Tabela 14 caracteriza a distribuição dos três gêneros em comum em todos os grupos amostrados, presentes entre os mais abundantes quanto a frequência relativa.

Tabela 14. Frequência Relativa (%) dos gêneros em comum presentes nas amostras estomacais de cavalos Puro Sangue Árabes alimentados com diferentes teores de inclusão de superfibra.

Frequência Relativa dos gêneros (%)	Tratamentos			
	Controle	P1	P2	P3
Lactobacillus	56,20	51,45	48,31	46,01
Actinobacillus	19,84	16,85	9,10	16,48
Streptococcus	6,99	4,47	4,71	2,96

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

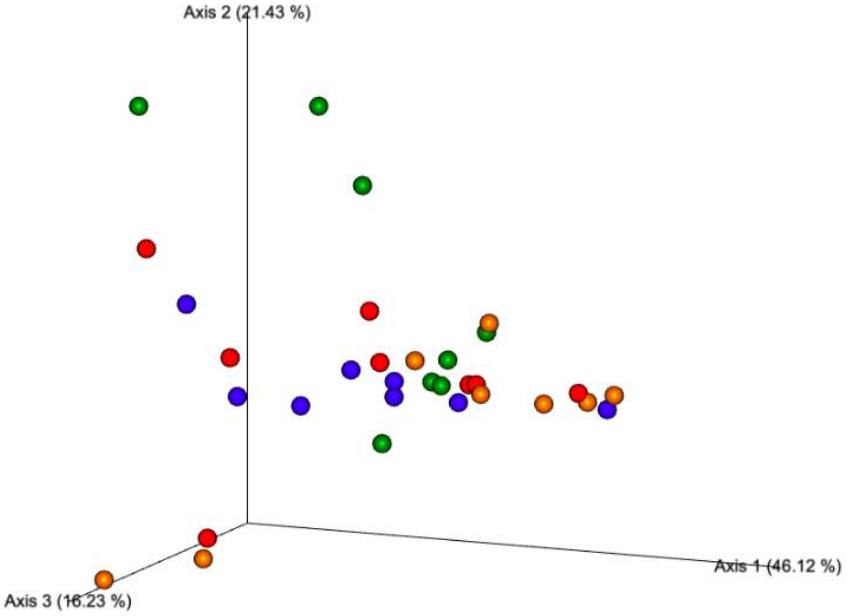
Com a frequência relativa de 56,20% no grupo Controle, os *Lactobacillus* foram reduzidos numericamente em até 18,13% conforme a suplementação de pectina foi aumentada. Do grupo Controle, *Actinobacillus* foi reduzido em até 54,13% quando comparado ao grupo P2. Os S*treptococcus* foram, em média, até 2,4 vezes mais

frequentes nas amostras Controle. Nossos resultados vão ao encontro de estudos que utilizaram técnicas de sequenciamento, onde predominaram os táxons *Actinobacillus* sp. e *Lactobacillus* sp., este último representando até 74% do DNA isolado no estômago antral no estudo mais recente (PERKINS et al, 2012; ERICSSON et al., 2016). Quando alocados em ASVs, *Actinobacillus* sp. estiveram presentes em até 19,84% das amostras e 56,20% foi ocupado por *Lactobacillus* sp. e foram identificadas em até 39% quanto a frequência relativa neste estudo, na região aglandular estomacal. No mesmo sentido, por mais que a redução do filo *Firmicutes* possa representar um estímulo ao aumento da diversidade entre comunidades bacterianas, já que não notamos o aumento de espécies associadas a predisposição de distúrbios gástricos ou metabólicos, o filo *Firmicutes* tem ação hidrolítica do polímero de celulose (HASTIE et al., 2008), o que pode ser prejudicial ao aproveitamento energético da dieta.

Os gêneros *Lactobacillus, Actinobacillus* e *Streptococcus* representam os três gêneros mais frequentes, comuns entre os quatro tratamentos (Figura 14). É importante ressaltar a dinâmica ocorrida quando abrangemos os cinco gêneros mais frequentes destas amostras, onde o grupo controle apresentou além dos supracitados, *Staphylococcus* e *Veillonella* entre os cinco gêneros mais frequentes relativamente. Quando realizada a suplementação de 120 g de superfibra como fonte péctica por cavalo por dia, o grupo P1 teve dentre os gêneros mais frequentes *Staphylococcus* e *Moraxella.* Já no grupo P2, a presença de *Acinetobacter* e *Weissella,* com *Rickettsia* e *Enterococcus* presentes entre os cinco gêneros mais frequentes relativamente para o grupo P3.

A dissimilaridade foi dada pela distribuição em PcOA (Figura 11), somando 83,78% entre os eixos, indicando boa confiabilidade da análise, mas não apontou formação de diferentes *clusters.*

Gráfico 1. Gráfico de análise de componentes principais (PCoA) de cavalos Puro Sangue Árabes suplementados com diferentes teores de inclusão de inclusão de pectina.



Legenda: Controle = Laranja; P1 = Azul; P2 = Verde; P3 = Vermelho.
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.
.

Não foram observadas alterações no pH estomacal de acordo com os tratamentos propostos, como descrito na Tabela 15.

Tabela 15. Determinação do pH estomacal de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação de diferentes teores de inclusão de pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
pH (1-14)	6,46±0,31	6,55±0,21	6,62±0,17	6,52±0,31	0,4348

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Esperava-se que o pH pudesse ser afetado por uma alta produção láctica decorrente dos altos teores de amido da dieta FRAPE, 2008) e que as concentrações de AGCC pudessem agir como diluidores destas concentrações (BRANDI & FURTADO, 2009). Porém, não foram observados indícios destas alterações. O pH se manteve em média em 6,54 ± 0,25. Este valor é similar ao encontrado por Julliand et al. (2006), que observaram um pH médio de 6,55 ± 1,05 no conteúdo estomacal de cavalos recebendo uma dieta referência a base de cevada, e dois níveis de um

suplemento a base de *Saccharomyces cerevisae.* Autores como Varloud et al. (2007) observaram valores reduzidos, variando de 5,08 a 5,23, porém neste estudo o método de coleta utilizado não permitiu identificar a região estomacal em que o conteúdo foi coletado, o que pode ter afetado os resultados.

Alguns autores relatam que o uso de fontes energéticas altamente disponíveis pode promover alta solubilização de sacarose no estômago dos cavalos e, quando associada ao uso do amido, podem causar úlceras na região aglandular (LINDBERG & KARLSON, 2001; Al JASSIM & ANDREWS, 2009). Neste estudo, as coletas realizadas por vídeoendoscópio permitiram a visualização da região aglandular e *margo plicatus,* e não sugeriu haver indícios clínicos de lesão, mas é necessário ressaltar que a existência ou grau de lesão não foi avaliada com a aplicação de método científico.

No conteúdo estomacal foram detectadas apenas concentrações de acetato e propionato como AGCC, e não foi possível observar alterações (P>0,05) entre os tratamentos. Não foi observada diferença nas concentrações de ácido lático (P=0,6255) no conteúdo estomacal. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16. Concentração de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta no estômago de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (mmol/L)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Ácido Lático	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,5743
Acetato	0,67±0,29	0,90±0,41	0,65±0,24	0,58±0,28	0,1886
Propionato	0,05±0,02	0,05±0,02	0,05±0,01	0,04±0,02	0,2351
Total	0,71±0,31	0,96±0,44	0,70±0,25	0,62±0,30	0,1899

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

As concentrações de AGV foram dosadas em aproximadamente 8,17mmol/L após a alimentação, representados em até 80% pela produção acética (NADEAU et al., 2000; de FOMBELLE et al., 2003; VARLOUD et al., 2006; JULLIAND et al., 2018). Em nosso estudo, dos AGCC avaliados, apenas foram identificados no conteúdo estomacal os ácidos acético e propiônico, uma hora após a alimentação. A superioridade na concentração acética em detrimento da propiônica pode indicar uma ação um pouco mais efetiva de bactérias fibrolíticas, porém não podemos afirmar uma

superioridade dessas bactérias em detrimento de outras (HANSEN et al., 2015). Já a ausência de butirato pode indicar que houve a retirada deste composto do meio, como alguns autores relatam a capacidade de absorção de AGV por todo trato gastrintestinal (ARGENZIO et al., 1974; NADEAEU et al., 2003; VARLOUD et al., 2006), já que as condições de pH se mantiveram em uma faixa adequada para os processos absortivos de AGCC dependentes do pKa.

Ao estudar dietas volumosas, Julliand et al. (2017) demonstraram que os valores de ácido lático no estômago dos cavalos variaram entre 0,75 a 1,51mMol/L, superiores as concentrações apresentadas no presente estudo. A baixa taxa de retenção à nível estomacal pode estar associado as baixas concentrações de ácido lático estomacal encontradas, já que *Lactobacillus spp.* esteve presente no grupo CON em uma frequência, pelo menos, 8,45% maior que os demais grupos, mas ainda assim as concentrações não diferiram, o que pode ter ocorrido pela evasão de ácido lático do conteúdo estomacal pela digesta para os compartimentos do intestino delgado. Estes resultados avaliados junto aos valores de pH obtidos podem indicar que por mais que houvesse uma ação amilolítica mais intensa no estômago dos cavalos, esta não foi suficiente para causar danos ou manifestações clínicas de desconforto estomacal nos cavalos. Ao mesmo tempo, é possível que a taxa de retenção da digesta tenha sido insuficiente para a ação de microrganismos fibrolíticos que resultariam em um perfil ácido diferente, já que foi fornecida apenas a fração concentrada da dieta alterando esta cinética.

5.4 RESPOSTA FERMENTATIVA FECAL

5.4.1 DINÂMICA BACTERIANA E INDICADORES FÍSICO-QUÍMICOS

A curva de rarefação obtida (>90% para todas as amostras) indicou uma boa cobertura das amostras. A taxonomia das amostras fecais permitiu alocar 99,89% das sequências a nível de filo, 99,88% em classe, 99,76% em ordem, 83,03% em família, 42,10% em gênero e 20,80% em espécie para as fezes.

Mesmo que a métrica de *Faith* tenha sido utilizada para considerar a árvore filogenética do microbioma das amostras, a alfa diversidade por *Faith* não foi alterada (P>0,05). O teste utilizado para explorar as a diferença em *Faith* foi o *Kruskal-Wallis* aos pares e não indicou alterações (P>0,2479). O teste de alfa diversidade de Pielou que considera a uniformidade das amostras (*Evenness*) não permitiu observar

diferença na comparação aos pares por *Kruskal-Wallis* (P>0,2075). Não foram observadas diferenças quanto a beta diversidade comparada aos pares para os dados absolutos por *Permanova* (P>0,8700), nem para dados relativos por *Permanova* (P>0,5430).

Abaixo está descrita a frequência relativa (%) calculada pela quantificação em ASV's para o nível de filos (Tabela 17).

Tabela 17. Frequência Relativa (%) dos filos presentes nas amostras fecais de cavalos Puro Sangue Árabes alimentados com diferentes teores de inclusão de pectina.

Frequência Relativa dos filos (%)	Tratamentos			
	Controle	P1	P2	P3
Firmicutes	43,47	38,60	39,73	38,83
Bacteroidetes	23,87	24,80	21,88	23,24
Verrucomicrobia	19,95	25,30	24,41	25,45
Fibrobacteres	4,74	3,54	3,78	3,21
Spirochaetes	3,66	3,26	3,76	2,89
Proteobacteria	1,12	1,28	2,73	2,56

Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Quanto a caracterização das populações, Ericsson et al. (2016) não identificaram OTU's que pudessem representar mais de 35% do DNA recuperado nas amostras obtidas a partir do intestino grosso dos cavalos. Em contraste com as proporções obtidas por Ericsson et al. (2016), em nosso estudo o filo *Firmicutes* correspondeu a 43,47% das OTU's para o grupo controle (COSTA et al., 2012; SHEPHERD et al., 2012; STEELMAN et al., 2012; DOUGAL et al., 2012; DOUGAL et al., 2013; COSTA et al., 2015). Assim como no presente resultado, *Firmicutes, Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia* foram descritos como dominantes no ceco-cólon equino (DOUGAL et al., 2014; COSTA et al., 2015; STEWART et al., 2018), acontecimento que pode estar diretamente relacionado ao substrato disponível em cada compartimento do trato gastrointestinal aumentando ou diminuindo a variabilidade entre os táxons (HANSEN et al., 2015).

A identificação dos filos predominantes mostrou um conflito quanto a frequência relativa de *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia.* A prevalência do filo *Bacteroidetes* foi superior a *Verrucomicrobia* quando avaliado nas fezes de cavalos saudáveis (COSTA et al., 2012; DOUGAL et al., 2013; COSTA et al., 2015). Isto também aconteceu nos estudos realizados por Shepherd et al. (2012), Steelman et al. (2012) e Costa et al. (2015). Em nossos resultados, embora não tenham representado significância,

Verrucomicrobia foi identificado como o filo de maior prevalência em relação a *Bacteroidetes* nos grupos que receberam algum nível de adição de superfibra, dinâmica que deve ser observada já que este último filo foi associado à degradação de pectinas e hemicelulose (JULLIAND et al., 2016).

Assim como afirmam alguns estudos, há predominância de filos como *Firmicutes* e *Bacteroidetes* no intestino grosso de cavalos, mas a proporção e ação destes filos são remodeladas de acordo com a matriz fermentável disponível e da condição de saúde intestinal (WILLING et al., 2009; BIDDLE et al., 2013). Esta é uma condição comum, porém certa relevância na proporção entre os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* tem sido discutida, sendo representada por, pelo menos, 4 vezes a frequência do primeiro em relação ao segundo (ERICSSON et al., 2016). Em nosso estudo, a proporção entre os filos foi de: CON = 1,87; P1 = 1,56; P2 = 1,81; P3 = 1,67. Já as *Proteobacterias* foram aumentadas em até 58,97% quando observados os tratamentos P2 e P3. As *Proteobacterias* foram relacionadas à ação fermentativa no íleo dos cavalos (ERICSSON et al., 2016).

Abaixo, na Tabela 18 estão indicados os gêneros com a maior frequência relativa entre os grupos.

Tabela 18. Gêneros de maior frequência relativa (%) entre os grupos de tratamento nas amostras fecais.

Frequência Relativa dos gêneros (%)	Tratamentos			
	Controle	P1	P2	P3
Streptococcus	20,21	13,06	14,28	13,24
Fibrobacter	4,73	3,53	4,19	3,21
Treponema	3,35	3,07	3,58	2,70
BF311	2,45	-	-	-
Phascolarctobacterium	2,15	2,93	2,35	2,91
Clostridium	1,86	3,33	1,96	2,00

Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

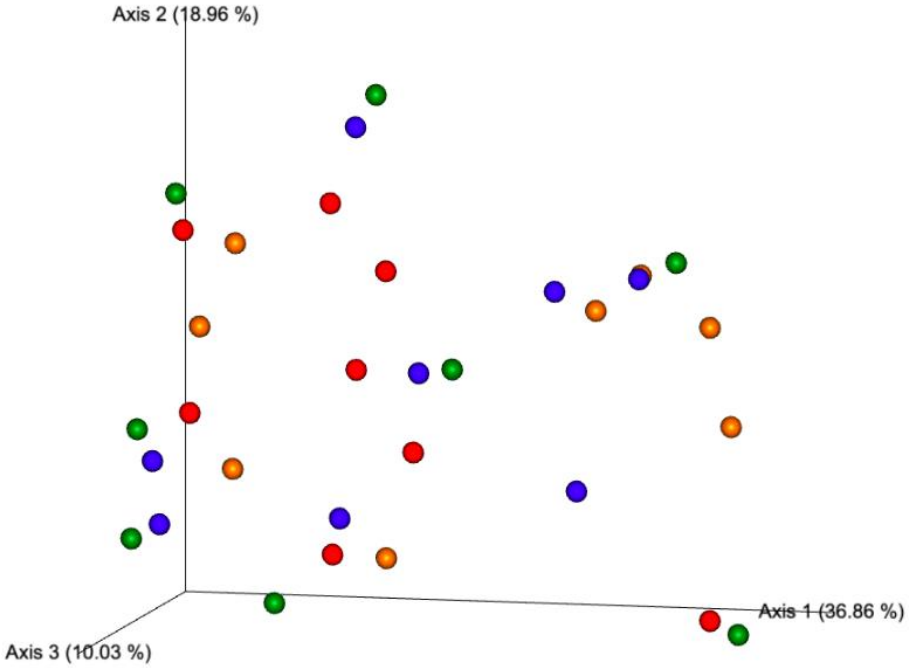
É importante ressaltar que o gênero *BF311* foi identificado em todas as amostras, porém, dentre os cinco gêneros mais frequentes relativamente, apenas no grupo COM, e que, notadamente, o gênero *Streptococcus* foi reduzido em até 35,37% quando a superfibra foi adicionada. A coleta fecal possibilitou aumentar a eficiência do uso das técnicas de sequenciamento, o que permitiu identificar a presença de famílias como *Fibrobacteraceae, Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* aeróbicas, nas fezes de equinos, como em Dougal et al. (2014) e Julliand & Grimm (2016).

Os resultados deste estudo não indicaram diferenças quanto a α-diversidade (riqueza e equidade da amostra) e β-diversidade (similaridade entre amostras). O uso de coprodutos classificados como superfibras ricas em pectina foram cogitados como possíveis moduladores das comunidades bacterianas, porém estes resultados não foram demonstrados objetivamente. Alguns estudos relataram a diminuição de espécies ligadas ao aproveitamento da celulose (JULLIAND et al., 2001; MEDINA et al., 2002; de FOMBELLE et al., 2003) e pectina (GOODSON et al., 1988), e outros caracterizaram os gêneros presentes em maiores concentrações no intestino grosso de cavalos alimentados com amido ou altos teores de fibras (DALY et al., 2012; HANSEN et al., 2015). A inibição de bactérias celulolíticas foi associada ao pH abaixo de 6,0, favorecendo a ação de cepas resistentes ao ambiente ácido como alguns *Lactobacillus e Streptococcus* (Al JASSIM & ROWE, 1999; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al, 2003).

O fornecimento da alta concentração de amido pode predispor um aumento nas concentrações de ácido lático, que contribui para a redução do pH local, o que pode inibir alguns táxons e favorecer outros (BESTEN et al., 2013). No mesmo sentido, alguns autores demonstraram o aumento de bactérias utilizadoras de lactato após observarem um aumento nas concentrações das bactérias anaeróbias totais (RESPONDEK et al., 2008; GRIMM et al., 2017). Em contrapartida, um estudo demonstrou o potencial de ação das bactérias amilolíticas ao relatar o desaparecimento de até 76% do amido fornecido na dieta nos compartimentos iniciais do trato gastrointestinal equino (VARLOUD et al., 2004). Um alto aproveitamento do amido anterior ao intestino grosso pode ter evitado o escape para este órgão, não promovendo alterações das concentrações do ácido lático fecal e pH nas fezes, mantendo as concentrações de ácido lático fecal encontrados neste estudo aceitáveis para a espécie e comparáveis aos de Ferreira (2021).

A redução de dimensionalidade foi dada pela análise de componentes principais (PCoA) e não foi indicada diferença entre os tratamentos propostos. A redução representou significativamente a distribuição obtida indicada pela soma dos eixos de 65,85%, como indicado abaixo na Figura 12. Não foi observada a formação de *Clusters,* indicando que não há relação entre os tratamentos *versus* influência microbiana.

Gráfico 2. Gráfico de análise de componentes principais (PCoA) de cavalos Puro Sangue Árabes suplementados com diferentes teores de inclusão de pectina.



Legenda: CON = Laranja; P1 = Azul; P2 = Verde; P3 = Vermelho.

Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

O pH fecal (P=0,5367), escore de cor (P=0,7250) e consistência das fezes (P=0,5139), não foram influenciados pelos tratamentos propostos, como descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Determinação do pH fecal, escore de cor e consistência (escala de 1 a 5) de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação de pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (escore)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
pH (1-14)	6,18±0,18	6,13±0,18	6,19±0,18	6,29±0,18	0,5367
Coloração	2,93±0,77	2,75±0,46	2,68±0,70	3,00±0,53	0,7250
Consistência	3,18±0,75	3,06±0,56	3,12±0,83	2,87±0,64	0,5139

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

O fornecimento deste coproduto para cavalos foi estudado por Borghi (2015) e não alterou os parâmetros de pH fecal. A avaliação microbiológica nas fezes de cavalos recebendo dietas contendo alta inclusão de amido ou carboidratos não estruturais mostrou uma intensificação na ação de bactérias gram positivas, como os *Lactobacillus* spp, *Streptococcus bovis* e *equinus,* também associadas à ocorrência de distúrbios sistêmicos e locais (GARNER et al., 1978; BAILEY et al., 2003; Al JASSIM & ROWE, 1999). Em nosso estudo não houveram ocorrências clínicas ou subclínicas de acidose ou outros distúrbios intestinais, respaldado pela determinação do pH fecal (>6,1 em todos os tratamentos) somado às características de escore fecal, que também não diferiram e se mantiveram dentre os valores aceitáveis para cavalos saudáveis de acordo com Berg et al. (2005) e Godoi et al. (2009).

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para os AGCC (P>0,05) e ácido lático fecal (P=0,6255). Os resultados estão abaixo na Tabela 20.

Tabela 20. Concentração de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta em mMol/L nas fezes de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementação com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis ($mmol.L^{-1}$)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Ácido Lático	8,89±2,14	6,35±2,14	8,46±2,14	8,75±2,14	0,6255
Acetato	32,88±3,40	33,55±3,40	32,15±3,40	28,12±3,40	0,6398
Propionato	11,36±1,47	12,20±1,47	12,17±1,47	10,30±1,47	0,5279
Butirato	3,50±0,68	3,69±0,68	3,84±0,68	3,86±0,68	0,9618
Valerato	0,70±0,10	0,73±0,10	0,65±0,10	0,61±0,10	0,7981
Isovalerato	0,56±0,22	0,66±0,22	0,55±0,22	0,70±0,22	0,7939
Isobutirato	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,5986

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Alguns autores demonstraram que a proporção dos AGVs pode auxiliar na diluição dos ácidos de alto peso molecular advindos da fermentação de grãos de cereais, e observaram um maior potencial de produção de AGVs quando a polpa de beterraba sacarina foi fornecida para os cavalos (MOORE-COOLYER & LONGLAND, 2000) ou inclusão mínima de 75% de casca de soja (COVERDALE et al., 2004), ambos coprodutos considerados superfibras e com algum teor de pectina. No atual estudo, mudanças nas proporções dos AGCCs não foram observadas e podem ter sido dependentes de fatores como o tempo de fornecimento da dieta, características

bromatológicas e quantidade de Superfibra usada, como demonstrado por Julliand & Grimm (2017).

Mesmo que vários fatores influenciem na modulação das populações microbianas no intestino grosso, é preciso ressaltar a alta variação individual dos cavalos utilizados que são estudados, demonstrada pela maior afinidade entre as comunidades intraindividual (COSTA et al., 2012; MORRISON et al., 2018). Quanto as respostas individuais deste estudo, pudemos notar uma alta variabilidade entre os cavalos. Um estudo demonstrou que as alterações microbiológicas podem estar relacionadas a maior flexibilidade na capacidade de mudanças no metabolismo microbiano do que propriamente às alterações da composição do meio (DESTREZ et al., 2019), o que pode ajudar a explicar os resultados encontrados neste estudo.

5.4.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES DA DIETA

Dos coeficientes de digestibilidade aparente para os nutrientes observados, o extrato etéreo apresentou melhor aproveitamento no grupo P1 em relação grupo P2. Foi realizado um teste de regressão linear, porém os resultados não se ajustaram ao modelo. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Coeficientes de Digestibilidade Aparente dos nutrientes da dieta para cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

*Variáveis (%)	**Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
CDMS[1]	63,37±4,20	63,69±3,80	63,52±4,54	62,90±3,28	0,8891
CDPB[2]	69,76±1,25	69,54±5,58	69,71±4,07	69,10±4,44	0,8942
CDEE[3]	64,41±15,06[AB]	72,78±13,56[A]	50,35±23,02[B]	63,87±17,20[AB]	0,0134
CDFB[4]	40,88±7,27	36,71±11,51	35,92±11,62	38,67±8,31	0,5679
CDFDN[5]	56,27±13,03	54,93±14,53	54,40±15,75	56,09±10,42	0,7598
CDFDA[6]	35,10±4,62	32,07±8,04	33,96±8,40	29,51±8,82	0,2495
CDIMO[7]	66,55±3,33	67,04±3,68	67,08±3,75	66,89±2,84	0,9290

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
*Legenda: [1]Coeficiente de digestibilidade da Matéria Seca; [2]Coeficiente de digestibilidade da Proteína Bruta; [3]Coeficiente de digestibilidade do Extrato Etéreo; [4]Coeficiente de digestibilidade da Fibra Bruta; [5]Coeficiente de digestibilidade da Fibra em Detergente Neutro; [6]Coeficiente de digestibilidade da Fibra em Detergente Ácido; [7]Coeficiente de Digestibilidade da Matéria Orgânica.
**Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

No geral, os resultados mostrados pelos coeficientes de digestibilidade aparente total dos nutrientes da dieta foram semelhantes aos achados na literatura,

tanto para dietas ricas em amido quanto para dietas compostas por coprodutos como a polpa de beterraba e casca de soja. A suplementação com pectina deste bestudo não alterou o coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS), com valores entre 62,90 e 63,69%, semelhantes ao encontrado por Brandi et al. (2014) de 58 a 68,7%, e ao encontrado por Manzano et al. (1999) entre 58,62 e 68,7% ao utilizarem a polpa cítrica como fonte péctica para cavalos. Embora os autores relacionem o aumento dos CDMS dos coprodutos como polpa de beterraba, polpa cítrica e casca de soja aos teores de pectina, carboidrato altamente fermentescível, este processo no presente estudo pode ter sido comprometido pelos teores de lignina maiores aos observados na polpa de beterraba e polpa cítrica, por exemplo.

O CDPB do presente estudo foi representado por valores entre 69,10% e 69,76%, indicando que não houve influência da adição da superfibra na fração digerida deste composto. Os teores de inclusão de pectina não foram suficientes para evitar a influência do amido sobre as comunidades ceco-colônica, mantendo a excreção de proteína microbiana próxima ao ocorrido com o grupo P0. Em contrapartida, Lindberg & Karlsson (2001), ao utilizar a polpa de beterraba incrementada à uma dieta contendo aveia como fonte amilácea, observaram a redução do CDPB, que foi relacionado a maior densidade da massa microbiana no intestino grosso devido ao aumento de matéria fermentável local que, consequentemente, aumentou a excreção de proteína microbiana subestimando os valores de digestibilidade reais da PB dietética.

Lindberg & Karlsson (2001), observaram o menor aproveitamento da fração de extrato etéreo quando substituíram grãos de cereais por polpa de beterraba combinado com baixo teor de gordura. Esta redução foi justificada pela excreção endógena de gordura pela massa microbiana aumentada, mesmo fato que culminou nas alterações do CDPB. De alguma forma, o maior aproveitamento do EE para o tratamento P1 pode ter relação com as características físicas da dieta, aumentando o tempo de retenção da digesta já que o teor de fibra foi aumentado conforme os tratamentos e a pectina apresenta características de alta higroscopia. Brandi et al. (2016) apontaram a pectina como fornecedor de energia prontamente disponível para a comunidade microbiana, aumentando assim a efetividade do trabalho fermentativo realizado, o que pode intensificar o resultado de melhor aproveitamento do extrato etéreo no tratamento P1.

5.5 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

5.5.1 RESPOSTA LOCAL

Grande parte dos estudos com superfibras na dieta de cavalos como a polpa de beterraba, casca de soja, polpa cítrica e outros, visam a substituição das frações de grãos ricos em amido da dieta por conta da ocorrência de síndrome inflamatória digestiva, em geral, causada por excessos. Visando elucidar os efeitos da pectina em amenizar os malefícios do excesso de amido, os indicadores inflamatórios foram analisados em conjunto. Não foi possível observar o efeito inflamatório esperado apesar do uso da pectina na dieta.

A Ultrassonografia Transabdominal foi usada para a medição da espessura da parede intestinal (mm) e não foi observada diferença entre os tratamentos para a espessura de cólon menor (P=0,8251) e na espessura de cólon dorsal direito (P=0,1895), indicados na Tabela 22.

Tabela 22. Indicador inflamatório local de espessura de parede intestinal (mm) de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (mm)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Cólon Dorsal Direito	2,89±0,38	2,75±0,28	3,05±0,42	2,85±0,46	0,1895
Cólon Menor	2,62±0,52	2,71±0,57	2,66±0,22	2,57±0,57	0,8251

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

De acordo com outros autores, os resultados ultrassonográficos se mantiveram entre os valores normais para a espessura da parede intestinal, variando entre 1,8mm a 4,2mm no cólon dorsal direito de cavalos saudáveis (HENDRICKSON et al., 2007; BITHELL et al., 2010). Com o uso de uma dieta desafio (4,4g de amido/kg de PC por dia) em pôneis da raça Mini Horse, Ferreira (2020) observou a espessura da parede do cólon dorsal direito maior do que o relatado na literatura para pôneis, reforçando os prejuízos causados pela alta disponibilidade de carboidratos não estruturais, o mesmo observado em outros estudos (KALCK, 2009; ONISHI et al., 2012; ROTH-WALTER et al., 2017).

Diferentes causas podem estar associadas ao espessamento da parede intestinal, mas a grande maioria está relacionada a fatores que desencadeiam algum processo inflamatório (SCHUMACHER et al., 2000; JONES et al., 2002; FREEMAN et al., 2001), estes fatores estão consequentemente relacionados ao mal aproveitamento

de nutrientes da dieta, desconfortos físicos ou distúrbios metabólicos, características não observadas no decorrer deste experimento.

A quantificação de IgA fecal se mostrou maior nos grupos P2 e P3 em relação a P1 e Controle. Os resultados apresentaram comportamento quadrático e estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23. Comparação de médias por Tukey do indicador inflamatório local de concentração de Imunoglobulina A (IgA) nas fezes de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
IgA Fecal	99,54±11,94[B]	74,75±13,35[B]	180,6±15,43[A]	229,58±13,36[A]	0,0001

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Os resultados após a realização do contraste ortogonal para a comparação das médias estão descritos na Tabela 24 e confirmam a diferença entre os tratamentos propostos.

Tabela 24. Comparação por contraste ortogonal do indicador inflamatório local de concentração de Imunoglobulina A (IgA) nas fezes de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados por tratamentos. Médias ± erro padrão descritos na Tabela 23.

Testes	P Valor
P0 × (P1 + P2 + P3)[A]	0,0010
P0 × P3[B]	<0,0001
P1 × (P2 + P3)[C]	<0,0001
P2 × P3[D]	0,0335

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

O aumento progressivo nas concentrações de imunoglobulina A (IgA) nas fezes dos cavalos, embora estes dados apresentem um comportamento quadrático, junto aos poucos estudos realizados para esta espécie, dificultam a justificativa para tal. Considerando que esta técnica não é comumente utilizada nas avaliações em cavalos, torna difícil qualquer correlação com os demais indicadores inflamatórios avaliados (RILEY et al., 2020). A concentração de IgA fecal é utilizada em outras espécies como um indicador de saúde local, amplamente utilizado em cães, já que se baseia em um mecanismo de defesa contra agentes de infecção presentes na mucosa intestinal (PETERS et al., 2004; TRESS et al., 2006).

Em camundongos e seres humanos, o IgA foi definido como um agente intermediário da resposta contra patógenos no intestino pelo aumento na secreção local, ao mesmo tempo que não caracteriza indícios de resposta inflamatória, o que está relacionado ao mecanismo de cascata do complemento não ser ativado (PETERSON et al., 2007; MACPHERSON et al., 2008), o que quer dizer que a presença de bactérias patogênicas ou até mesmo de diferentes ingredientes possa estimular o acúmulo de IgA produzido pela mucosa intestinal aumentando as concentrações nas fezes.

Neste caso, é possível que uma melhor estabilidade no ambiente fermentativo possa ter reduzido a presença de antígenos por patógenos ou que a presença de agressão não tenha surgido, utilizando menos a IgA na barreira intestinal e aumentando sua excreção nas fezes, já que a produção pela mucosa é constante.

5.5.2 RESPOSTA SISTÊMICA

O resultado para a dosagem de fibrinogênio plasmático está representado na Tabela 25. Não houve diferença entre os tratamentos (P=0,7350).

Tabela 24. Dosagem de fibrinogênio plasmático (mg/dL) de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis ($mg.dL^{-1}$)	Tratamentos				P
	Controle	P1	P2	P3	Valor
Fibrinogênio Plasmático	275±103,51	250±92,58	300±106,90	275,00±103,51	0,7350

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

As dosagens de fibrinogênio plasmático não sofreram interferência dos tratamentos propostos, permanecendo entre a faixa referente a cavalos hígidos de 100 a 500 mg/dL (MEYER & HARVEY, 2004). De acordo com os resultados encontrados e a faixa considerada normal para cavalos saudáveis, nossos valores estiveram em concordância com outros estudos (MONTGOMERY et al., 1996; BORGES et al., 2007; EVANS et al., 2008). Reforçando a inexistência desta resposta inflamatória, as avaliações foram realizadas em um período contínuo de estímulo estressante nutricional como preconizaram outros estudos (COPAS et al., 2013; OCHONSKY, 2017; LONG, & NOLEN-WALSTON, 2020; BASTOS, 2021).

Com exceção das concentrações de IgA fecal que não apresenta estudos de referência para a variável em cavalos, os valores apresentados para todas as variáveis citadas e estudadas estiveram dentro de valores de referência (HENDRICKSON et al., 2007; BITHELL et al., 2010), o que não indica uma resposta inflamatória. Neste estudo não foram observadas manifestações clínicas que pudessem caracterizar este quadro, sem registro de pulso digital, inconsistência fecal, alterações de coloração das fezes, muco nas fezes ou quadros de desconforto.

5.6 ACEITABILIDADE E COMPORTAMENTO

Todos os cavalos aceitaram e consumiram totalmente a superfibra fonte de pectina nas quantidades ofertadas, sem registro de sobras em, no máximo, 30 minutos de avaliação. Não houve recusas para acessar o cocho e não foram observados comportamentos de recusa parcial ou total do coproduto.

Apesar do aumento de volume dietético e da característica de higroscopicidade, não foi observado aumento no tempo médio de consumo das refeições ou na ingestão de água. Os resultados estão descritos na Tabela 26.

Tabela 26. Tempo de consumo (min) médio das refeições de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e suplementados com pectina. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (min)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Tempo de Consumo	41,17±6,65	35,51±6,29	41,26±6,65	34,92±6,65	0,7549

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Por se tratar de um coproduto oriundo da indústria de cítricos, a aceitabilidade por parte dos cavalos é ponto que merece atenção. Originada deste mesmo mercado, a polpa cítrica é um coproduto amplamente estudado e pode-se afirmar que um dos maiores entraves para sua colocação no mercado equestre é a baixa aceitação pelos cavalos. As pesquisas já realizadas com base em diferentes percentuais de substituição da dieta por polpa cítrica utilizaram métodos desde avaliações pelo teste de primeira escolha (MULLER & UDÉN, 2007; TRIBUCCI et al., 2013) até a taxa de ingestão e sobras (OTT et al., 1979; MANZANO, et al., 1999).

Ao avaliar a taxa de ingestão de dietas contendo 0%, 7%, 14%, 21% e 28% de polpa cítrica, Moreira et al. (2015) mostraram que há preferência pelo grupo sem a inclusão de polpa cítrica. As avaliações de palatabilidade de Tribucci et al. (2013) foram divididas entre os testes de primeira escolha, taxa de ingestão e sobras. Os resultados apresentados acerca da taxa de ingestão e sobras corroboram com os resultados do nosso estudo, indicando que não houve ações de rejeição durante a primeira escolha para os teores de 0%, 7%, 14%, 21% ou 28% de polpa cítrica na dieta, sugerindo que o ingrediente foi aceito. As características físicas do coproduto usado neste estudo e a restrição de informações sobre o processamento industrial reduzem as possibilidades de comparação com outros coprodutos disponíveis na indústria do cavalo, e neste caso consideramos a matéria prima original de ambos os ingredientes para discorrer sobre as respostas encontradas.

Possivelmente, fatores como a composição química, aroma, textura, forma, tamanho, sensação de mastigação e deglutição da superfibra influenciaram positivamente neste estudo. O ingrediente utilizado permitiu um grau satisfatório de homogeneidade quando adicionado em qualquer dos teores de inclusão testados à ração farelada, o que pode ter contribuído com a redução do odor cítrico, alteração da textura e sensação de mastigação e deglutição (CARCIOFI, 2008). O sabor e a palatabilidade não foram considerados como passíveis de avaliação qualitativa ou quantitativa neste estudo, reforçado pela inexistência de métodos que proponham a avaliação destes.

Quanto ao consumo hídrico não houve diferença conforme os tratamentos propostos, como descrito na Tabela 27.

Tabela 25. Tempo de consumo médio das refeições de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis ($L.dia^{-1}$)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Consumo Hídrico	29,25±7,83	26,75±7,94	27,31±8,83	29,06±7,89	0,6343

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Na literatura existem indícios da diminuição do consumo hídrico por influência dietética (FREIRE et al., 2009), esta variável foi apontada por Lewis (2000) como dependente do estado fisiológico, grau de exercício, umidade e temperatura do ambiente e teor de umidade da dieta. Freire et al. (2009), ainda relatam a diferença

nos teores de amido dos dois tratamentos propostos, onde o primeiro fornecimento foi baseado em 35% de grãos na dieta (resultando em 2g de amido/kg de peso do cavalo) e 50% de grãos na dieta (fornecendo 3g de amido/kg de peso do cavalo), similar ao ocorrido neste estudo. Os autores observaram um aumento na quantidade de água ingerida do grupo que recebeu a menor quantidade de amido por tratamento, e indicaram que não houve relação da proporção do componente com a ingestão hídrica, e sim da quantidade de matéria seca consumida, o que aumentou o tempo destinado a ingestão de concentrado e reduziu o tempo destinado ao consumo de água.

Ao observar as características comportamentais como um todo, é possível notar que não foram observadas diferenças entre os tempos de ingestão do concentrado, o que poderia justificar a redução ou o aumento das ações de consumo de água durante o dia, alterando as respostas de quantidade ingerida de água (FREIRE et al., 2009).

As avaliações comportamentais realizadas individualmente, em baias, apontaram uma redução do tempo em ócio dos cavalos (P=0,0032) do grupo P3 em relação aos demais (Tabela 28).

Tabela 26. Frequência diária (%) das manifestações comportamentais em baias de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (%)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Alimentação	20,76±4,09	21,9±4,05	18,65±5,68	22,00±6,46	0,3037
Água	1,49±1,13	1,11±1,41	1,15±0,42	1,86±0,92	0,7873
Ócio	60,40±16,15[A]	55,51±16,15[A]	48,57±20,31[A]	25,54±24,16[B]	0,0032
Fezes	0,27±0,25	0,41±0,50	0,22±0,33	0,36±0,33	0,5843
Urina	0,13±0,27	0,18±0,28	0,45±0,42	0,13±0,18	0,1296
Self-Grooming	0,27±0,37	0,60±0,62	0,19±0,29	0,55±0,56	0,1685
Estereotipia	5,25±9,75	5,47±9,46	5,29±11,72	6,75±14,07	0,7290
Busca Alimento	5,31±3,91	7,52±4,71	6,97±4,25	6,39±3,14	0,7184
Interação -	0,90±2,28	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,3175
Outros	11,85±14,07	17,57±14,65	10,54±14,00	14,95±14,67	0,2352

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

O uso de dietas ricas em amido foi associado a redução do comportamento exploratório dos cavalos (FREIRE et al., 2009; BULMER et al., 2015). Embora outras características não tenham sido afetadas no presente estudo, a suplementação com

360 g de superfibra por animal dia^{-1} reduziu em até 57,71% o tempo em ócio dos cavalos.

Durante as avaliações contínuas em liberdade, não foram observadas alterações comportamentais (Tabela 29).

Tabela 27. Frequência diária (%) das manifestações comportamentais em pista de areia de cavalos desafiados com alta inclusão de amido e adição de superfibra. Resultados apresentados em valores médios ± erro padrão.

Variáveis (%)	Tratamentos				P Valor
	Controle	P1	P2	P3	
Ócio	25,00±12,21	19,27±8,48	17,50±9,38	20,83±8,49	0,2961
Self-Grooming	1,81±2,35	1,11±1,62	1,35±1,54	0,44±1,17	0,3019
Estereotipia	11,25±9,07	9,26±2,99	11,25±10,68	12,08±10,53	0,6242
Busca Alimento	51,66±15,93	57,28±11,66	58,33±20,70	43,75±20,42	0,1641
Interação +	6,66±3,98	8,81±4,60	10,00±7,56	14,16±16,49	0,3873
Interação -	2,69±3,30	3,57±2,51	2,69±1,72	5,62±6,28	0,1699
Outros	0,00±0,00	1,40±2,62	0,83±1,54	2,50±3,88	0,2314

Letras maiúsculas diferindo nas linhas indicam diferença entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
Legenda: Níveis de suplementação onde: P1 = 0 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P2 = 0,27 g/Kg PC de pectina/animal/dia; P3 = 0,81 g/Kg PC de pectina/animal/dia.
Fonte: PEREIRA, 2022.

Os resultados coletivos foram obtidos através da avaliação três horas após fornecimento da primeira refeição diária, considerando que, em média, 38 minutos foram destinados ao consumo da fração concentrada, assim como relatado por Bulmer et al. (2015), onde ações de reatividade foram aumentadas e o bem-estar poderiam ter sido afetados em decorrência das respostas glicêmicas ao alto teor de amido.

Dentre os estudos que relacionaram o alto nível de amido com a maior reatividade dos cavalos estão Bulmer et al. (2015), indicando por meio das alterações na frequência cardíaca ao submeter os cavalos a situações de estresse, com estes recebendo dieta com alta quantidade de fibras (0,6 g de amido/Kg de PC por dia) ou alta quantidade de amido (1,4 g de amido/Kg de PC por dia). Após a comparação entre as duas dietas foi demonstrada uma superioridade das concentrações de bactérias anaeróbias totais e amilolíticas decorrentes da dieta com proporção amido:volumoso elevada, e as dietas foram compostas por feno (exclusivamente) ou feno e aveia, na proporção de 56:44. Destrez et al. (2019) relacionaram o ambiente propício a espécies amilolíticas às alterações comportamentais e manifestações ligadas a ansiedade, o que poderia ter causado um aumento de comportamentos negativos quando em momento coletivo de avaliação. Este efeito não pôde ser

comprovado no presente estudo, já que alterações de reatividade não foram observadas independente dos tratamentos propostos.

6 CONCLUSÕES

A suplementação com pectina oriunda de polpa cítrica processada não interfere na aceitabilidade e não provoca alterações metabólicas plasmáticas de glicose, insulina e lipídicas. A suplementação não afeta as atividades fermentativas e microbianas fecais e estomacais. A pectina interfere nos parâmetros inflamatórios de IgA fecal, digestibilidade aparente do extrato etéreo e melhora os indicadores comportamentais de equinos.

Um novo estudo com base nesta fonte péctica pode ser desenvolvido visando o aumento de períodos experimentais, alterações nas concentrações de pectina fornecidas aos cavalos ou ambas as alterações. Este coproduto pode ser utilizado como um ingrediente nas dietas comerciais ou ser matéria prima para a extração e purificação de pectina para a formulação de suplementos.

IMPLICAÇÕES

Os resultados aqui obtidos podem auxiliar em pesquisas futuras com o uso de pectina oriunda de coprodutos da indústria de hortifrutigranjeiros, visando este carboidrato como ingrediente energético na dieta de equinos. Pesquisas acerca da origem da pectina utilizada, bem como das quantidades testadas podem ser desenvolvidas a partir deste estudo. Além disso, pouco se sabe a respeito da estrutura e composição das pectinas normalmente utilizadas, o que pode ser estudado a partir desta pesquisa.

O uso desta superfibra não foi correlacionado a alterações negativas no trato gastrointestinal dos cavalos. A possibilidade de disponibilizar este produto no mercado pode reduzir a competição de alimentos comuns ao mercado de nutrição humana e nutrição animal, além de manter a densidade energética da dieta, reduzir o *status* de ociosidade dos cavalos e reduzir a inflamação causada pelo excesso de amido nas dietas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL JASSIM, R. A. M. Supplementary feeding of horses with processed sorghum grains and oats. **Anim Feed Sci Technol**, v. 125, p. 33–44, 2006.

AL JASSIM, R. A. M.; ANDREWS, F. M. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v; 25 n. 2, p. 199-215, 2009.

AL JASSIM, R. A. M.; SCOTT, T.; TREBBIN, A. L. et al. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. **Microbiol. Lett**, v. 248, p. 75–81, 2005.

AL JASSIM, R.; ROWE, J. Better understanding of acidosis and its control. **Rec Adv Anim Nutr Aust**, v. 12, p. 91-97, 1999.

ALMEIDA, M. L. M.; FERINGER JR., W. H.; CARVALHO, J. R. G. et al. Intense exercise and aerobic conditioning associated with chromium or L-carnitine supplementation modified the fecal microbiota of fillies. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0167108, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists.** 17 ed. Gaithersburg, MD, USA, 2000.

ARAI, T.; WASHIZU, T.; HAMADA, S. et al. Glucose transport and glycolytic enzyme activities in erythrocytes of two-years-old thoroughbreds undergoing training exercise. **Veterinary Research Committee**, v. 18, n. 6, p. 417-422, 1994.

ARAUJO, J. R.; MARTEL, F. Regulação da absorção intestinal da glicose: uma breve revisão. **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 2, p. 35-43, 2015.

ARGENZIO, R.; SOUTHWORTH, M.; STEVENS, C. Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract. **Am J Phys**, v. 226, n. 6, p. 1043-1050, 1974.

ASSIS, A.J.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Polpa cítrica em dietas de vacas em lactação. 1. Consumo de nutrientes, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 242-250, 2004.

BAILEY, S. R.; BAILLON, M. L.; RYOCROFT, A. N. et al. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an *in vitro* model of carbohydrate overload. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2087-2093, 2003.

BASTOS, F. L. Avaliação dos diferentes volumosos em dietas de equinos. 2021. 81 f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2021.

BASTOS, R. N.; MARQUES, T. L. P.; RAMOS, M. T. et al. Avaliação das concentrações de fibrinogênio plasmático em equinos da raça Mangalarga Marchador: efeito do exercício, do gênero e da idade. **Revista de Saúde,** v. 7, n. 2, p. 12-15, 2016.

BEDFORD, A.; GONG, J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 151–159, 2018.

BECCATI, F.; PEPE, M.; GIALLETTI, R. et al. Is there a statistical correlation between ultrasonographic findings and definitive diagnosis in horses with acute abdominal pain? **Equine Vet J**, v. 43, n. 39, p. 98-105, 2011.

BEMARK, M.; BOYSEN, P.; LYCKEL, N. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. In: THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, v. 1247, 2012. **Anais.** New York Academy of Sciences, 2012, p. 97-116.

BERG, E. L.; FU, C. J.; PORTER, J. H. et al. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. **Journal Animal Science**, v. 83, n. 7, p. 1549-1553, 2005.

BESTEN, G. D.; EUNEN, K. V.; GROEN, A. K. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.

BIDDLE, A. S., BLACK, S. J., BLANCHARD, J. L. An *in vitro* model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. **PLoS One**, v. 8, p. e77599, 2013.

BITHELL, S.; HABERSHON-BUTCHER, J. L.; BOWEN, M. et al. Repeatability and reproducibility of transabdominal ultrasonographic intestinal wall thickness measurements in Thoroughbred horses. **Veterinary Radiology & Ultrasound, v.** 51, p. 647–651, 2010.

BONHOMME-FLORENTIN, A. Degradation of hemicellulose and pectin by horse caecum contents. **The British Journal of Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 185-192, 1988.

BORGES, A. S.; DIVERS, T. J.; STOKOL, T. et al. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 489-494, 2007.

BORGHI, R. T. Casca de soja na dieta de equinos submetidos a exercício moderado. 2015. 62p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

BRAGA, A. C.; ARAÚJO, K. V.; LEITE, G. G. Neutral detergent fiber levels in diet of equines. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 11, 2008.

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

BRANDI, R. A.; TRIBUCCI, A. M. O.; BALIEIRO, J. C. C. et al. Citrus Pulp in concentrates for horses. **Food and Nutrition Sciences,** v. 5, p. 1272-1279, 2014.

BRANDTZAEG, P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, p. 554–63, 2010.

BRANDTZAEG, P.; JOHANSEN, F. E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. **Immunol Vet,** v. 206, p. 32-63, 2005.

BRØKNER, C.; AUSTBØ, D.; NAESSET, J. A. et al. Glycaemic and insulinemic response to dietary carbohydrates in horses. **Acta Vet Scand**, v. 58, n. 1, 2016.

BRUSS, M. L. Lipids and ketones. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. 6 ed. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** p.81-115, 2008.

BRYDEN, W. L. Nutrition of performances horses. In: **Proceedings of Equine Nutrition and Pastures for Horses Workshop**, Richmond NSW, Australia, 1995.

BUCHANAN, B. R.; SOMMARDAHL, C. S.; MOORE, R. R. et al. What is your diagnosis? Pyloric duodenal intussusception. **J Am Vet Med Ass**, v. 228, p. 1339–1340, 2006.

BULMER, L.; McBRIDE, S.; WILLIAMS, K. et al. The effects of a high-starch or high-fibre diet on equine reactivity and handling behaviour. **Applied Animal Behaviour Science,** v. 165, p. 95-102, 2015.

CAANITZ, H.; HOUPT, K. A.; PETERSSON, K. H. et al. Effect of exercise on equine behavior. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 31, n. 1-2, p. 1-12, 1991.

CANAL JUNIOR, A. Influência do tempo de estabulação no comportamento de equinos da raça crioula. **Unoesc & Ciência - ACET Joaçaba**, v. 6, n. 2, p. 203-210, 2015.

CARCIOFI, A. C. IV Curso Teórico-Prático sobre Nutrição de Cães e Gatos “Uma Visão Industrial” FCAV/Unesp Jaboticabal, p.79. 2008.

CARSLAKE, H. B.; PINCHBECK, G. L.; McGOWAN, C. M. Evaluation of chemiluminescent immunoassay for measurement of equine insulin. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 167-178, 2017.

CARTER, R. A.; TREIBER, K. H.; GEOR, R. J. et al. Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 2, p. 171-178, 2009.

CIPRIANO-SALAZAR, M.; ADEGBEYE, M. J.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y. et al. The dietary components and feeding management as options to offset digestive disturbances in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 74, p. 103-110, 2019.

CLARKE, L. L.; ROBERTS, M. C.; ARGENZIO, R. A. Feeding and digestive problems in horses. Physiologic responses to a concentrated meal. **Vet Clin North Am Equine Pract,** v. 6, p. 433-450, 1990.

COENEN, M.; MOSSELER, A.; VERVUERT, I. Fermentative gases in breath indicate that inulin and starch start to be degraded by microbial fermentation in the stomach and small intestine of the horse in contrast to pectin and cellulose. **Journal of Nutrition (Supplement),** 136, n. 7, p. 2108-2110, 2006.

COHEN, N. D.; GIBBS, P. G.; WOODS, A. M. Dietary and other management factors associated with colic in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 1, p. 53-60, 1999.

COPAS, V. E. N.; DURHAM, A. E.; STRATFORD, C. H. et al. In equine grass sickness, serum amyloid A and fibrinogen are elevated, and can aid differential diagnosis from non-inflammatory causes of colic. **Veterinary Record,** v. 172, n. 15, p. 395-395, 2013.

COSTA, M. C.; ARROYO, L.G.; ALLEN-VERCOE, E. et al. Comparison of fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **PLoS ONE**, v. 7, p. e41484, 2012.

COSTA, M. C.; SILVA, G.; RAMOS, R. V. et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **Veterinary Journal**, v. 205, p. 74–80, 2015.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. **The Veterinary Journal**, v. 249, p. 10-15, 2019.

COVERDALE, J. A.; MOORE, J. A.; TYLER, H. D. et al. Soybean hulls as an alternative feed for horses. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 6, p. 1663-1668, 2004.

CRANDELL, K. G.; PAGAN, J. D.; HARRIS, P. et al. A comparison of grain, oil and beet pulp as energy sources for the exercised horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 30, p. 485–489, 1999.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 580p.

DALY, K.; PROUDMAN, C. J.; DUNCAN, S. H. et al. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 989-995, 2012.

DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHET, A. G. et al. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 293-304, 2003.

DELFINE C. Le sondage nasogastrique chez le cheval adulte. **Equine Veteterinary Journal**, v. 31, p. 285- 290, 1999.

DESTREZ, A.; GRIMM, P.; JULLIAND, V. Dietary-induced modulation of the hindgut microbiota is related to behavioral responses during stressful events in horses. **Physiology & Behavior,** v. 202, p. 94-100, 2019.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A. et al. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PLoS One**, v. 9, p. e87424, 2014.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A. et al. Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. **PLoS ONE**, v. 8, p. e77660, 2013.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; EDWARDS, A. et al. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, p. 642-652, 2012.

DYER, J.; AL-RAMMAHI, M.; WATERFALL, L. et al. Adaptative response of equine intestinal Na+/Glucose co-transporter (SGLT1) to an increase in dietary soluble carbohydrate. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 458, n. 2, p. 419-430, 2009.

DUREN, S. Feeding the endurance horse. In: PAGAN, J. D. (Ed.). **Advances in Equine nutrition.** Nottingham: Nottingham University Press, 2000. p. 351-363.

DYER, J.; MEREDIZ, E. F. C.; SALMON, K. S. H. et al. Molecular characterization of carbohydrate digestion and absorption in equine small intestine. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 4, p. 349-358, 2002.

EDWARDS, G. B.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Molecular characterization of carbohydrate digestion and absorption in equine small intestine. **Equine Veterinary Journal,** v. 34, p. 349-358, 2002.

ELLIS, A. D.; HILLS, J. Nutritional Physiology of the Horse**. Journal of Equine Veterinary Science**,v. 25, n. 12, 2005.

ERICSSON, A. C.; JOHNSON, P. J.; LOPES, M. A. et al. A microbiological map of the healthy equine gastrointestinal tract. **PLoS One**, v. 205, n. 1, p. 74-80, 2016.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J., EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal Dairy Science**, v. 44, p. 1768-1771, 1961.

EVANS, P. A.; HAWKINS, K.; LAWRENCE, M. et al. Rheometry and associated techniques for blood coagulation studies. **Medical Engineering & Physics**, v. 30, n. 6, p. 671-679, 2008.

EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L. Qualidade da matéria prima e novos testes laboratoriais como instrumento de maximização da dieta balanceada. In.: 42ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Anais.** Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005, Goiânia, Brasil. p. 296-32.

FERNANDES, K. A.; KITTELMANN, S.; ROGERS, C. W. et al. Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population Dynamics of microbial communities following dietary changes. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112846, 2014.

FRAPE, D. L. **Equine nutrition and feeding.** 2 ed. London: Blackwell Science Ltd., 1998. 564p.

FRAPE, D. L. **Equine Nutrition and feeding**. 3 ed. São Paulo: Rocca, 2008. 602p.

FREEMAN, S. L. Ultrasonography of the equine abdomen: Findings in the colic patient. **In Pract**, v. 24, p. 262–273, 2002.

FREEMAN, S. L.; MASON, P. J.; STALEY, C. Comparison of ultrasonographic and histologic assessment of normal and strangulating intestine in the horse. **European Journal of Ultrasound**, v. 13, p. 1-35, 2001.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FERREIRA, E. M.; PIRES, A. V.; SUSIN, I. et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybeen oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 30-39, 2016.

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

GARNER, H. E.; MOORE, J. N.; JOHNSON, J. H. et al. Changes in caecal flora associated with onset of laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 10, p. 249-52, 1978.

GEELEN, S. N. J.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; BEYNEN, A. C. Dietary fat supplementation and equine plasma lipid metabolism. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, p. 475–478, 1999.

GEOR, R. J. Digestive strategy and flexibility in horses with reference to dietary carbohidrates. In: ELLIS, A. D.; LONGLAND, A. C.; COENEN, M. et al. (Ed.). **The impact of nutrition on the health and welfare of horses.** Wageningen: Academic Publishers, 2010. p. 17-28. (EEAP Scientific Series, v. 128).

GEOR, R. J.; HARRIS, P. A.; COENEN, M. **Equine Applied and Clinical Nutrition.** Health, Welfare and Performance. 1ed. Saunders, Amsterdam, The Netherlands, 2013, p.3-32.

GILAVERTE, S.; SUSIN, I.; PIRES, A. V. et al. Diet digestibility, ruminal parameters and performance of Santa Ines sheep fed dried citrus pulp and wet brewer grain. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 639–647, 2011.

GOACHET, A. G.; HARRIS, P.; PHILIPPEAU, C. et al. Effects of physical training on nutrient digestibility and faecal fementative parameters in Standardbred horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1081-1087, 2014.

GOBESSO, A. A. O.; D'AURIA, E.; PREZOTTO, L. D. et al. Substituição de milho por sorgo triturado ou extrusado em dietas para equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.11, p.2011-2016, 2008.

GOBESSO, A. A. O; ETCHICURY, M.; TOSI, H. Resposta plasmática de glicose e insulina em equinos alimentados com diferentes fontes de amido. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science,** v. 46, n. 4, p. 324-331, 2009.

GODOI, F. N.; ALMEIDA, F. Q.; GUARIENTI, G. A. et al. Perfil hematológico e características das fezes de equinos consumindo dietas hiperlipidêmicas. **Ciência Rural,** v. 39, n. 9, p. 2571-2577, 2009.

GONÇALVES, S.; LEBLOND, A.; DROGOUL, C. et al. Using feces characteristics as a criterion for the diagnosis of colic in the horse: a clinical review of 207 cases. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 157, n. 1, p.3-10, 2006.

GOODSON, J.; TYZNIK, W. K.; CLINE, J. H. et al. Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1946-1950, 1988.

GRIMM, P.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. **Animal**, v. 7, p. 1136-1145, 2017.

GUSTAFFSON, A. Antibiotic Associated Diarrhea in Horses with special reference to *Clostridium* difficile. 2004. 59f. **Dissertação** (Mestrado). Swedish University of Agriculture Science, Uppsala, Sweden.

HALL, M. B. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 3226-3232, 2003.

HALLEBEEK, J. M.; BEYNEN, A. C. The concentration of plasma triacylglycerols in horses fed diets containing either medium chain triacylglycerols or an isoenergetic amount of starch or cellulose. **Archives of Animal Nutrition**, v. 55, p. 147–159, 2001.

HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND, L. T. et al. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 27216, 2015.

HARRIS, P. A. Energy sources and requirements of the exercising horse. **Animal Review of Nutrition**, v. 17, p. 185-210, 1997.

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

HELESKI, C. R.; SHELLE, A. C.; NIELSEN, A. J. et al. Influence of housing on wealing horse behavior and subsequent welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 78, n. 2-4, p. 291-302, 2002.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L. et al. Relationship between condition score, physical measurement and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p. 371-372, 1983.

HENDRICKSON, E. H. S.; MALONE, E. D.; SAGE, A. M. Identification of normal parameters for ultrasonographic examination of the equine large colon and cecum. **Canadian Veterinary Journal,** v. 48, p. 289–291, 2007.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis nonstructural carbohydrates in plan tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306-1311, 1993.

HILL, J. Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: A review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilization. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, p. 92-117, 2007.

HINEY, K. M.; POTTER, G.D. A review of recent research on nutrition and metabolism in the athletic horse. **Nutrition Research Reviews**, v. 9, p. 149-173, 1996.

HOFFMAN, R. M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 38, 2009.

HOFFMAN, R. M.; WILSON, J. A.; KRONFELD, D. S. et al. Hydrolyzable carbohydrates in pasture, hay, and horse feeds: Direct assay and seasonal variation. **Journal of Animal Science,** v. 79, p. 500-506, 2001.

HUSTED, L.; JENSEN, T. K.; OLSEN, S. N. et al. Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Heliobacter spp* by fluorescence *in situ* hybridisation. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 84, 2010.

IACOB, S.; IACOB, D. G. I. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1676, p. 1-17, 2019.

IACOB, S.; IACOB, D. G. I. Infectious threats, the intestinal barriers and its Trojan horses: dysbiosis. **Fonto Microbiology**, v. 10, n. 1676, p. 1-17, 2019.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. 1ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JENSEN, R. B.; AUSTBØ, D.; BACH KNUDSEN, K. E. et al. The effect of dietary carbohydrate composition on apparent total tract digestibility, feed mean retention time, nitrogen and water balance in horses. **Animal**, v. 8, p. 1788–1796, 2014.

JENVEY, C.; CARAGUEL, C.; HOWARTH, G. B. et al. Identification of periparturient mare-associated predictors of post parturient immunoglobulin A concentrations in Thoroughbred foals. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 43, p. 73–7, 2012.

JONES, S. L.; DAVIS, J.; ROWLINGSON, K. Ultrasonographic findings in horses with right dorsal colitis: five cases. **Journal of American Veterinary Medical Association,** v. 222, p. 1248–1251, 2002.

JOSE-CUNILLERAS, E.; HINCHCLIFF, K. Carbohydrate metabolism in exercising horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 1, n. 1, p. 23–32, 2004.

JOOST, H. G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). **Molecular Membrane Biology**, v. 18, n. 4, p. 247-256, 2001.

JOUANY, J. P. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. **Sciences des Aliments**, v. 2, n. 2, p. 131-144, 1982.

JULLIAND, S.; MARTIN, A.; JULLIAND, V. Effect of live yeast supplementation on gastric ecosystem in horses fed a high-starch diet. **Livestock Science**, v. 215, p. 25-29, 2018.

JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; DROGOUL, C. et al. Feeding and microbial disorders in horses: 3-Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, p. 543-546, 2001.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. The impact of diet on the hindgut microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science,** v. 52, p. 23-28, 2017.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. The microbiome of the horse hindgut: history and current knowledge. In: Horse Species Symposium. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 2262–2274, 2016.

JULLIAND, V.; VAUX, A.; MILLET, L. et al. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the Predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3738-3741, 1999.

KABE, A. M. G.; DE SOUZA, A. D.; DE MORO SOUSA, R. L. M. et al. Soybean hulls in equine feed concentrates: Apparent nutrient digestibility, physicochemical and microbial characteristics of equine feces. **Journal of Equine Veterinary Science,** v. 36, p. 77–82, 2016.

KALCK, K. A. Inflammatory bowel disease in horses. **Vet Clin Equine,** v. 25, p. 303-315, 2009.

KARLSSON, C. P.; JANSON, A.; ESSÉN-GUSTAVSSON B. et al. Effect of molassed sugar beet pulp on nutrient utilisation and metabolic parameters during exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 44-49, 2002.

KANEKO, J. J. Carbohydrate metabolism and its diseases. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 6ed., 2008, p. 45-80.

LEIVA, E.; HALL, M. B.; VAN HORN, H. H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal Dairy Science**, v. 83, p. 2866-2875, 2000.

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

LIMA, RADS; CINTRA, A. G. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento – Mapa: **Estudo do complexo do Agronegócio do cavalo.** 2016.

LINDBERG, J. E. Feedstuffs for horses. In: GEOR, R. J.; HARRIS, P. A.; COENEN, M. **Equine applied and clinical nutrition: Health, welfare and performance**, p. 319–331, 2013.

LINDBERG, J. E.; KARLSSON, C. P. Effect of partial replacement of oats with sugar beet pulp and maize oil on nutrient utilization in horses. **Equine Veterinary Journal,** v. 33, n. 6, p. 585-590, 2001.

LONG, A.; NOLEN-WALSTON, R. Equine inflammatory markers in the twenty-first century: A focus on Serum Amyloid A. **Veterinary Clinical Equine,** v. 36, p. 147-160, 2020.

MACLEAY, J. M. Deseases of the musculoskeletal system. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SEELON, D. C. **Equine Internal Medicine.** 3ed., St Louis: W. B. Saunders Company, p. 461-522, 2004.

MACPHERSON, A. J.; McCOY, K. D.; JOHANSEN, F. E. et al. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal Immunology, v.** 1, p. 11-22, 2008.

MANZANO, A.; FREITAS, A. R.; ESTEVES, S. N. et al. Polpa de citros peletizada na alimentação de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia, v.** 28, n. 6, p 1327-1332, 1999.

MARCHELLO, E.V.; SCHURG, W.A.; MARCHELLO, I. A. et al. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 7, p. 453-458, 2000.

MARTIN, E. J.; REED, K. J.; KUNZ, I. G. Z. et al. Normal variation and changes over time in the equine intestinal microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 52-60, 2017.

MARTIN-ROSSET, W.; MARTIN, L. Nutritional principles for horses. In: **Equine nutrition: INRA nutrient requirements, recommended allowances and feed tables.** Wageningen Academic Publishers, 2015, p. 23-96.

MARYCZ, K.; MICHALAK, I.; KORNICKA, K. Advanced nutritional and stem cells approaches to prevent equine metabolic syndrome. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 115-125, 2018.

MAZANEC, M.B.; NEDRUD, J.G.; KAETZEL, C. S. et al. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defence. **Immunology Today, v.** 14, p. 430–434, 1993.

MCKENZIE, H. C. Equine hyperlidemias. **Veterinary Clinics: Equine Pratice**, v. 27, n. 1, p. 59-72, 2011.

MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E. et al. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 10, p. 2600-2609, 2002.

MELO, U. P., FERREIRA, C., PALHARES, M. S. et al. Choque circulatório em equino. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 31, p. 205-230, 2010.

MERRITT, A. M.; JULLIAND, V. Gastrointestinal physiology. In: GEOR, R. J.; HARRIS, P. A.; COENEN, M. **Equine Applied and Clinical Nutrition.** Health, Welfare and Performance. 1ed. Saunders, Amsterdam, The Netherlands, 2013. p.3-32.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. 2 ed. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. Ed. Saunders.** 2004.

MEYER, H.; RADICKE, S.; KIENZLE, E. et al. Investigation on preileal digestion of starch from grain, potato and manioc in horses. **Journal of Veterinary Medicine Series**, v. 42, n. 6, p. 371-381, 1995.

MOORE-COLYER, M. J. S.; LONGLAND, A. C. Intakes and *in vivo* apparent digestibilities of four types of conserved grass forage by ponies. **Animal Science,** v. 71, n. 3, p. 527-534, 2000.

MONTGOMERY, H. E.; CLARKSON, P.; NWOSE, O. M. et al. The acute rise in plasma fibrinogen concentration with exercise is influenced by the G-453 – A polymorphism of the beta-fibrinogen gene. **Arterioscler, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, n. 3, p. 386-391, 1996.

MOREIRA, C. G.; BUENO, I. C. S.; MENEZES, M. L. et al. Palatabillity and digestibillity of horse diets containing increasing levels of citrus Pulp. **Revista MVZ Córdoba**, v. 20, n. 2, p. 4544-4555, 2015.

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

MOROTOMI, M.; WATANABE, T.; SUEGARA, N. et al. Distribution of indigenous bacteria in the digestive tract of conventional and gnotobiotic rats. **Infection and Immunity**, v. 11, p. 962–968, 1975.

MORRISON, P. K.; NEWBOLD, C. J.; JONES, E. et al. The Equine Gastrointestinal Microbiome: Impacts of Age and obesity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

MOTTET, R.; ONAN, G.; HINEY, K. Revisting the Henneke body condition scoring system: 25 years later. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, p. 417-418, 2009.

MUHONEN, S. Metabolism and hindgut ecosystem in forage fed sedentary and athletic horses. 2008. **Tese** (doutorado). Uppsala, Faculty of Veterinary Medicine and animal Science.

MÜLLER, C.E.; UDÉN P. Preference of horses for grass conserved as hay, haylage or silage. **Animal Feed Science Technology**, v. 132, p. 66-78, 2007.

MURRAY, M.J. Disorders of the stomach. In: BRADFORD P.S. **Large animal internal medicine**. 4.ed. St Louis, Missouri, Mosby, 2009. p.695-701

NADEAU, J. A,; ANDREWS, F. M.; MATHEW, A.; et al. Evaluation of diets as a cause of gastric ulcers in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 784-790, 2000.

NADEAU, J. A.; ANDREWS, F. M.; PATTON, C. S. Effects of hydrochloric, acetic, butyric and propionic acids on pathogenesis of ulcers in the non-glandular portion of the stomach of horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 64, p. 404-412, 2003.

National Research Council of the National Academies: Nutrient Requirements of Horses - NRC. 6ed. The National Academies Press, Washington DC, 2007. 341f.

NUNN, F. G. Role of clostridium botulinum in the aetiology of equine grass sickness and other dysautonomias, 2006.

OCHONSKI, P. Influence of feed particle size and dietary starch on inflammation in horses. 2017. **Dissertação** (Mestrado). Pennsylvania, Pennsylvania State University.

OERTLY, M.; GERBER, V.; ANHOLD, H. et al. The accuracy of Serum Amyloid A in determining early inflammation in horses after long-distance transportation by air. **Journal of Equine Veterinary Science,** v. 97, 2021.

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

ONISHI, K. C.; PARK, J. W.; PRADO, J. et al. Intestinal bacterial overgrowth includes potential pathogens in the carbohydrate overload models of equine acute laminits. **Veterinary microbiology,** v. 159, n. 3-4, p. 354-363, 2012.

OTT, E. A. Citrus pulp for horses. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 983-987, 1979.

OTT, E. A.; FEASTER, J. P.; LIEB, S. Acceptability and digestibility of dried citrus pulp by horses. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 983-987, 1979.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: Propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

PAGAN, J. D. Forages for horses: more than just a filler. **Equine neurology and nutrition**. Glenelg, 1996. p. 189-205.

PERKINS, G. A.; DEN BAKKER, H. C.; BURTON, A. J. et al. Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2522-2532, 2012.

PERKINS, G. A.; DEN BAKKER, H. C.; BURTON, A. J. et al. Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. **American Society for Microbiology,** v. 78, n. 8, p. 2522-2532, 2012.

PETERS, I. R.; CALVERT, E. L.; HALL, E. J. et al. Measurement of Immunoglobulin Concentrations in the Feces of Healthy Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 11, n. 5, p. 841-848, 2004.

PETERSON, D. A.; McNULTY, N. P.; GURUGE, J. L.; GORDON, J. I. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. **Cell Host & Microbe,** v. 2, n. 5, p. 328-339, 2007.

PETHICK, D. W. Carbohydrate and lipid oxidation during exercise. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 3, p. 431-441, 1993.

PILLINER, S. **Horse nutrition and feeding.** 2 ed. Oxford: Blackwell Science, 1999.

PI-SUNYER, F. X. Glycemic index and disease. **American Journal of Clinical Nutrition,** v. 76, n. 1, p. 290-298, 2002.

POTTER, G. D.; ARNOLD, F. F.; HOUSEHOLDER, D. D. et al. Digestion of Starch in the small or large intestine of the Equine. **European Conference on Horse Nutrition**, v. 1, 1992.

PRYCE, J.D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, n. 1125, p. 1151-1152,1969.

QUADROS, J. B. S.; FURTADO, C. E.; BARBOSA, E. D. et al. Digestibilidade aparente e desenvolvimento de equinos em crescimento submetidos a dietas compostas por diferentes níveis de substituição de feno Tifton 85 pela casca de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 564-574, 2004.

RAIGOND, P.; EZEKIEL, R.; RAIGOND, B. Resistant starch in food: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 10, p. 1968–1978, 2014.

RAMALHO, L. O.; CAIADO, J. C. C.; SOUZA, V. R. C. et al. Glicemia e concentrações séricas de insulina, triglicérides e cortisol em equinos da raça Quarto de Milha e mestiços usados em provas de laço em dupla. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science,** v. 49, n. 4, p. 318-324, 2012.

REECE, W. O. Função renal nos mamíferos. In: DUKES, H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006. p.67-96.

RESENDE, K. T.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; FERNANDES, M. H. M. R. Metabolismo de energia. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**, 1, ed., Jaboticabal. 2006. p. 311-332.

RESPONDEK, F.; GOACHET, A. G.; JULLIAND, V. Effects of dietary short chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 316-323, 2008.

RETORE, M.; SILVA, L.P.; TOLEDO, G.S.P. et al. Efeito da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, n. 5, p. 1232-1240, 2010.

RIBEIRO, R. M.; RIBEIRO, D. S. F.; PAZ, C. F. R. et al. Adiposity and weight gain in Mangalarga Marchador horses subjected to hypercaloric diet. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 30, p., 2020.

RICHARDSON, K.; MURRAY, J. A. M. D. Fiber for performance horses: A review. **Journal of Veterinary Science**, v. 46, p. 31-39, 2016.

RILEY, C. B.; JENVEY, C. J.; BAKER, F. J.; CORRIPIO, A. A pilot study to investigate the measurement of immunoglobulin A in Welsh Cob and Welsh Pony foas' faeces and their dam's milk. **New Zeland Veterinary Journal,** v. 68, n. 4, p. 225-230, 2020.

ROTH-WALTER, F.; BERGER, S.; LUCKSCHANDER-ZELLER, N. Inflammatory bowel disease in humans, pets, and horses. In: **Comparative Medicine**. Springer, Cham, 2017. p. 47-69.

SANTOS, T. M.; ALMEIDA, F. Q.; GODOI, F. N. et al. Capacidade tamponante, pH e consistência das fezes em equinos submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1782-1788, 2009.

SCHUMACHER, J.; EDWARDS, J.E.; COHEN, N. D. Chronic Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases of the Horse. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 258–265, 2000.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN,K. A.; GIBB, D. J.; CREWS JR., D. H.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; McALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behaviour, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 149-158, 2003.

SELLIN, J. H. SCFAs: the enigma of weak electrolyte transport in the colon. **News in Physiology Science,** v. 14, p. 58-64, 1999.

SHEPHERD, M. L.; SWECKER, W. S. J.; JENSEN, R. V.; PONDER, M. A. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, p. 62-68, 2012.

SIWINSKA, N.; ZAK, A., BARON, M.; CYLNA, M., BOROWICZ, H. Right dorsal colon ultrasonography in normal adult ponies and miniature horses. **PLoS ONE,** v. 12, n. 10, 2017.

STEELMAN, S. M.; CHOWDHARY, B. P.; DOWD, S. et al. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 231, 2012.
STEWART, A. S., PRATT-PHILLIPS, S., GONZALEZ, L. M. Alterations in intestinal permeability: the role of the “leaky gut” in health and disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 10-22, 2017.

STEWART, H.L.; PITTA, D.; INDUGU, N. et al. Characterization of the fecal microbiota of healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, p. 811–819, 2018.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Glucose, ketoamines and related regulatory hormones. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2. ed., Ames: Blackwell Publishing, 2008b, p. 708-731.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Monovalent Eletrolites and osmolarity. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2. ed., Ames: Blackwell Publishing, 2008a, p. 495-558.

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

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. 4ed., Livraria Varela: São Paulo, Brasil, 2005.

TRESS, U.; SUCHODOLSKI, J. S.; WILLIAMS, D. A.; STEINER, J. M. Development of a fecal sample collection strategy for extraction and quantification of fecal immunoglobulin A in dogs. **American Journal of Veterinarian Research,** v. 67, n. 10, p. 1756-1759, 2006.

TRIBUCCI, A. M. O.; BRANDI, R. A.; BALIEIRO, J. C. C.; TITTO, E. A. L.; BUENO, I. C. S. Palatability of horse diets containing citrus pulp (Citrus sinensis) through the preference test. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 33, p. 204-207, 2013.

TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Aceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, n. 24, 1969.

TRINDER, P. Rapid determination of salicylate in biological fluids. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 301, 1954.

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

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant.** Ithaca: Comstock Publ. Association, 1994. 476p.

VAN WEYENBERG, S.; SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: a review. **Livestock Science**, v. 99, p. 3-12, 2006.

VALADARES FILHO, S. C.; LOPES, S. A.; SILVA, B. C. et al. **CQBAL 4.0.** Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes. 2018.

VARLOUD, M.; FONTY, G.; ROUSSEL, A. et al. Postprandial kinetics of some biotic and abiotic characteristics of the gastric ecosystem of horses fed a pelleted concentrate meal. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 10, p. 2508-2516, 2007.

VARLOUD, M.; DE FOMBELLE, A.; GOACHET, A. G. et al. Partial and total apparent digestibility of dietary carbohydrates in horses as affected by the diet. **Animal Science, v.** 79, p. 61–72, 2004.

VARLOUD, M.; GUYONVARCH, A.; JULLIAND, V. In vivo colonization of the equine stomach by commensal bacteria. **Proceedings of the nineteenth Equine Science Society**, p. 180-181, 2005.

VARLOUD, M.; ROUSSEL, A.; BOISOT, P. et al. A technique for the collection and the study of biochemical and microbial characteristics of postprandial gastric contents from conscious horses. **Animal Feed Science Technology**, v. 133, p. 259–274, 2006.

VENABLE, E. B.; FENTON, K. A.; BRANER, V. M. et al. Effects of feeding management on the equine cecal microbiota. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 49, p. 113-121, 2017.

VERVUERT, I.; COENEN, M.; BOTHE, C. Effects of corn processing on the glycemic and insulinemic responses in horses. **Journal of Animal Physiology,** v. 88, p. 348-355, 2004.

WATANABE, T.; M. MOROTOMI, M.; SUEGARA, N.; KAWAI, Y.; MUTAI, M. Distribution of indigenous lactobacilli in the digestive tract of conventional and gnotobiotic rats. **Microbiology Immunology**, v. 21, p. 183–191, 1977.

WILLING, B.; VÕRÕS, A.; ROOS, S.; JONES, C.; JANSSON, A.; LINDBERG, J. E. Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, p. 908-914, 2009.

WOLINSKY, I.; HICKSON, J. F. **Nutrition in exercise and sport.** 2ed., Texas: CRC Press Inc., 1994, p. 29-31.

YUKI, N.; SHIMAZAKI, T.; KUSHIRO, A.; WATANABE, K.; UCHIDA, K.; YUYAMA, T; MOROTOMI, M. Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 66, n. 11, p. 5030–5034, 2000.

ZEDER, M. A. The Domestication of Animals. **Journal of Anthropological Research**, n. 68, p. 161-190, 2012.

ZEYNER, A.; GEIBLER, C.; DITTRICH, A. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and fecal water (dry matter, pH, value, organic acids, ammonia, buffering capacity of horses). **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 7-19, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – SAL MINERAL UTILIZADO

Sal Mineral Kromium® - DSM Tortuga

Níveis de garantia:

Cálcio (mín)	130,00 g/Kg
Cálcio (máx)	146,00 g/Kg
Cromo (mín)	40,00 mg/Kg
Cobalto (mín)	14,00 mg/Kg
Cobre (mín)	1.000,00 mg/Kg
Enxofre (mín)	5.000 mg/Kg
Ferro (mín)	2.500,00 mg/Kg
Fluor (máx)	750,00 mg/Kg
Fósforo (mín)	75,00 g/Kg
Iodo (mín)	90,00 mg/Kg
Manganês (mín)	2.000,00 mg/Kg
Selênio (mín)	11,00 mg/Kg
Sódio (mín)	150,00 g/Kg
Zinco (mín)	3.700,00 mg/Kg

ANEXO B – NÚCLEO EQUINO INCLUSO NA FORMULAÇÃO DA RAÇÃO BASE

Núcleo equino – Agromix® (Jaboticabal, São Paulo, Brasil)

Composição Básica: carbonato de cálcio, cloreto de sódio, enxofre ventilado (flor de enxofre), fosfato bicalcico, iodato de cálcio, levedura inativada, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco.

Níveis de garantia:

Cálcio (mín)	190,00 g/Kg
Cálcio (máx)	215,00 g/Kg
Cloro (mín)	105,00 g/Kg
Cobalto (mín)	12,00 mg/Kg
Cobre (mín)	250,00 mg/Kg
Enxofre (mín)	2,00 g/Kg
Ferro (mín)	1.000,00 g/Kg
Fluor (máx)	720,00 mg/Kg
Fósforo (mín)	72,00 g/Kg
Iodo (mín)	20,00 mg/Kg
Magnésio (mín)	28,00 g/Kg
Manganês (mín)	1.000,00 mg/Kg
Selênio (mín)	2,00 mg/Kg
Sódio (mín)	68,00 g/Kg
Zinco (mín)	1500,00 mg/Kg