

FERNANDO JOSÉ GONZÁLEZ GONZÁLEZ

**Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem in vitro**

São Paulo

2023

FERNANDO JOSÉ GONZÁLEZ GONZÁLEZ

**Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem in vitro**

**VERSÃO CORRIGIDA**

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

**Departamento:**  
Clínica Médica

**Área de concentração:**  
Clínica Médica

**Orientador:**  
Profa. Dra. Márcia de Oliveira Sampaio  
Gomes

**Co-orientador:**  
Prof. Dr. Ricardo de Souza Vasconcellos

São Paulo, SP

2023

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)

4268  
FMVZ

González, Fernando José González

Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem *in vitro* / Fernando José González González. – 2022.  
113 f. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Vasconcellos.

1. Fermentação. 2. Digestibilidade. 3. Felino. 4. AGCC. I. Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 18 de abril de 2022

CEUAx N 5030170322

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marcia De Oliveira Sampaio Gomes

Área: Clínica Médica Veterinária

Equipe envolvida: Fernando Jose Gonzã[ã]lez Gonzã[ã]lez - (executante); Ricardo Souza Vasconcellos - (colaborador);

Título do projeto: "Efeitos da inclusão de mananoligossacarídeos associados à fitoterápico nas propriedades fermentativas e microbiota fecais em dietas extrusadas para gatos."

### Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 14/04/2022, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

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



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 18<sup>o</sup> April 2022

### CERTIFIED

We certify that the Research "Effects of mannanoligosaccharides inclusion associated to phytotherapeutic in fermentative and microbiota fecal properties in extruded feed for cats", protocol number CEUAX 5030170322 (ID 002541), under the responsibility Marcia De Oliveira Sampaio Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day April 14, 2022.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Efeitos da inclusão de mananoligosacarídeos associados à fitoterápico nas propriedades fermentativas e microbiota fecais em dietas extrusadas para gatos.", protocolado sob o CEUAX nº 5030170322, sob a responsabilidade de Marcia De Oliveira Sampaio Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 14 de abril de 2022.

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



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da inclusão de mananoligosacarídeos associados à fitoterápico nas propriedades fermentativas e microbiota fecais em dietas extrusadas para gatos.", protocolada sob o CEUA nº 3158280121 (03/03/2021), sob a responsabilidade de **Ricardo Souza Vasconcellos e equipe; Fernando Jose González González** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 19/03/2021.

We certify that the proposal "Effects of mannanoligosaccharides inclusion associated to phytotherapeutic in fermentative and microbiota fecal properties in extruded feed for cats ", utilizing 18 Cats (males and females), protocol number CEUA 3158280121 (03/03/2021), under the responsibility of **Ricardo Souza Vasconcellos and team; Fernando Jose González González** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 03/19/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2021](#) a [12/2021](#) Área: [Dzo-Zootecnia](#)

Origem: [Fazenda Experimental de Iguatemi](#)

Espécie: [Gatos](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) Idade: [1 a 6 anos](#) N: [18](#)  
Linhagem: [SRD](#) Peso: [2000 a 6000 g](#)

Local do experimento: O referido laboratório encontra-se na Fazenda Experimental Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá. Este local é distante pelo menos 200 m de outras criações de animais e possui barreiras naturais. Conta com um laboratório para a manipulação de amostras e processamento, uma sala de armazenamento de alimentos e quarentena de animais, uma sala de galotas metabólicas e um galil coletivo. Os pisos e paredes são revestidos em piso cerâmico branco para facilitar a higienização e a área coletiva de manutenção dos animais conta com enriquecimento ambiental.

Maringá, 19 de março de 2021

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos  
Coordenadora da CEUA/UEM  
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Erika Seki Kioshima Cótica  
Coordenadora Adjunta da CEUA/UEM  
Universidade Estadual de Maringá

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GONZÁLEZ, Fernando José

Título: **Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem in vitro.**

Tese apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **Dedicatória**

*El proceso de doctorado que termina con la redacción y escritura de este trabajo, está dedicado a mis padres, que siempre me impulsaron a buscar los sueños y luchar por ellos y parte de su esencia está plasmada en estas pocas hojas, que no alcanzan para expresar toda su sabiduría.*

*En memoria de Roselina y Luis Germán.*



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Clínica Médica pela oportunidade, ensino profissional e pessoal.

À Universidade Estadual de Maringá, à Faculdade de Zootecnia pelo ensino e ajuda.

À Alltech, pelo financiamento do projeto de tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. Número de processo 88882.376853/2019-01

## RESUMO

GONZÁLEZ, F. J. **Efeitos de aditivos com ação prebiótica utilizados em alimentos extrusados para gatos: uma abordagem *in vitro***. 2022. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Entender o comportamento de ingredientes no ambiente intestinal usando metodologias que substituam o uso de animais em experimentação é necessário e consonante nas novas tendências em nutrição animal. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* aditivos usados em nutrição felina, nas propriedades fermentativas e comparar as metodologias *in vivo* e *in vitro* na digestibilidade e fermentação. Para tal, foram desenvolvidos dois estudos, o primeiro em dois experimentos determinou a produção de gás, amônia, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), lactato, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR) de um *blend* comercial (Advantage Pet Biobalance FT, Alltech, Brasil) e de seus ingredientes prebióticos isolados [mananoligossacarídeos (MOS), extrato de yucca e óleo essencial de orégano (carvacrol)]. No experimento 1 (Exp. 1), foram avaliadas nos substratos celulose, pectina e mix de aminoácidos, as propriedades em FIV do *blend* comercial nas doses de 16, 32, 48 e 64 mg por frasco de fermentação e o segundo experimento (Exp. 2), analisou em FIV diferentes compostos como aditivos fermentativos [pectina, celulose, extrato de yucca, MOS, fructoligossacarídeos (FOS), galactoligossacarídeos (GOS), carvacrol e o *blend* comercial nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg por frasco de fermentação usando como substrato uma ração comercial após de um processo de digestibilidade *in vitro* (DIV). Para o segundo estudo, 19 rações foram analisadas em dois ensaios; o primeiro, comparou o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS) e orgânica (CDAMO) *in vivo*, com duas metodologias *in vitro*, uma de digestibilidade [Hervera et al., (2007) modificada] e outra de digestibilidade mais fermentação *in vitro*; o segundo ensaio, comparou os produtos de fermentação (amônia, lactato, pH, acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, isovalerato e metilvalerato) *in vivo* e *in vitro*. No primeiro estudo, o emprego do *blend* comercial nas doses de 32, 48 e 64 mg/frasco apresentou redução ( $p < 0,01$ ) na produção de (H<sub>2</sub>S) em todos os substratos. Para amônia (mmol/g MO), houve uma diminuição amônia nas doses de 48 e 64 mg/frasco nos substratos celulose (0,034 e 0,028, respectivamente) e aminoácidos de (0,033 e 0,039) quando comparado ao controle (0,057). A produção de gás e AGCC para a pectina, *blend* comercial e

oligossacarídeos, tiveram as maiores respostas de produção nas doses altas de inclusão, a pectina e GOS apresentaram diminuição do H<sub>2</sub>S nas doses de 40 mg/frasco. O carvacrol e oligossacarídeos, apresentaram baixos níveis de amônia com a inclusão da maior dose dos aditivos. A pectina e oligossacarídeos tiveram as maiores produções de AGCC e baixas de AGCR na dose de 40 mg/frasco. No segundo estudo, a metodologia de DIV da MO, apresentou correlação positiva (r=0,789) com o CDAMO *in vivo* e para o acetato, butirato e o pH tiveram correlações positivas entre metodologias (r = 0,596, 0,541 e 0,576, respectivamente) sem predizer os valores absolutos. As metodologias *in vitro* são úteis para avaliar aditivos nos produtos fermentativos como AGCC e amônia. O coeficiente de digestibilidade da MO *in vitro* (Hervera et al., 2007), pode usar-se como estimativa do CDAMO e os resultados de AGCC *in vitro*, podem ser interpretados como tendência de produção, mas não como valor absoluto nas fezes felinas.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos de cadeia curta. Digestibilidade. Felino. Fermentação.

## ABSTRACT

GONZÁLEZ, F. J. **Effects of additives with prebiotic action used in extruded cat food: an in vitro approach.** 2022. 113 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Understanding the behavior of ingredients in the intestinal environment using methodologies that replace the use of animals in experimentation is necessary and in line with new trends in animal nutrition. The objective of this study was to evaluate in vitro additives used in feline nutrition, in the fermentative properties and to compare the in vivo and in vitro methodologies in the digestibility and fermentation. For this, two studies were developed, the first in two experiments determined the production of gas, ammonia, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), lactate, short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain (BCFA) of a commercial blend (Advantage Pet Biobalance FT, Alltech, Brazil) and its isolated prebiotic ingredients [mannanooligosaccharides (MOS), yucca extract and essential oil of oregano (carvacrol)]. In experiment 1 (Exp. 1), the in vitro fermentation (IVF) properties of the commercial blend at doses of 16, 32, 48 and 64 mg per fermentation flask were evaluated in the substrates cellulose, pectin and amino acid mix, and the second experiment (Exp. 2), analyzed in IVF different compounds as fermentative additives [pectin, cellulose, yucca extract, MOS, fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS), carvacrol and the commercial blend at doses of 5, 10, 20 and 40 mg per vial fermentation using a commercial feed as substrate after an in vitro digestibility (IVD) process. For the second study, 19 diets were analyzed in two trials; the first one compared the in vivo apparent digestibility coefficient of dry matter (ADCDM) and organic matter (ADCOM) with two in vitro methodologies, one of digestibility [Hervera et al., (2007) modified] and the other of digestibility plus fermentation in vitro; the second assay compared the fermentation products (ammonia, lactate, pH, acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate, isovalerate and methylvalerate) in vivo and in vitro. In the first study, the use of the commercial blend at doses of 32, 48 and 64 mg/flask showed a reduction ( $p < 0.01$ ) in the production of (H<sub>2</sub>S) in all substrates. For ammonia (mmol/g OM), there was a decrease in ammonia at doses of 48 and 64 mg/vial in cellulose substrates (0.034 and 0.028, respectively) and amino acids (0.033 and 0.039) when compared to the control (0.057). The production of gas and SCFA for pectin, commercial blend, and oligosaccharides, had the highest production responses at high inclusion doses, pectin and GOS showed a decrease in H<sub>2</sub>S at doses of 40 mg/bottle. Carvacrol and oligosaccharides showed low

levels of ammonia with the inclusion of the highest dose of additives. Pectin and oligosaccharides had the highest SCFA productions and lowest SCFA yields at the dose of 40 mg/vial. In the second study, the IVD MO methodology showed a positive correlation ( $r=0.789$ ) with ACDOM in vivo and for acetate, butyrate, and pH there were positive correlations between methodologies ( $r = 0.596, 0.541$  and  $0.576$ , respectively) without predict the absolute values. In vitro methodologies are useful to evaluate additives in fermentation products such as SCFA and ammonia. The in vitro MO digestibility coefficient (Hervera et al., 2007) can be used as an estimate of the ADCOM and the in vitro SCFA results can be interpreted as a production trend, but not as an absolute value in feline feces.

Keywords: Digestibility. Feline. Fermentation. Short chain fatty acids.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Composição química analisada dos substratos e aditivo fermentativos usados na fermentação <i>in vitro</i> .....	49
Tabela 2.	Composição química analisada do alimento extrusado usado para formar o substrato da fermentação <i>in vitro</i> .....	52
Tabela 3.	Matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO) dos aditivos e o resíduo da ração depois da digestão <i>in vitro</i> .....	52
Tabela 4.	Produção de gás (PSI) dos substratos em diferentes concentrações (g) com 24 horas de incubação.....	54
Tabela 5.	Pressão de gás (PSI) em dois diluições fecais usadas como inóculo aferidas em 24 com diferentes substratos .....	54
Tabela 6.	Pressão de gás (PSI) em diferentes tempos (horas) usando distintos substratos (0,2 g).....	55
Tabela 7.	Produtos de fermentação do composto aditivo em diferentes níveis com distintos substratos após 24 horas incubação.....	55
Tabela 8.	Média dos parâmetros fermentativos em várias doses de aditivos usando como substrato uma ração depois de DIV (primeira etapa) .....	57
Tabela 9.	Média dos parâmetros fermentativos em várias doses de aditivo usando como substrato uma ração depois de DIV (segunda etapa) .....	59

### CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Composição química analisada na matéria seca das rações utilizadas nos experimentos.....	91
Tabela 2.	Coeficientes de digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica pelos métodos <i>in vivo</i> , DIV e FIV para cada ração .....	98
Tabela 3.	Digestibilidade (%) da matéria seca e orgânica determinados pelos métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	99
Tabela 4.	Correlação de Pearson (r) e probabilidades (p*) do método <i>in vivo</i> na MS e MO com as metodologias <i>in vitro</i> .....	99
Tabela 5.	Equações de predição dos CDAMS e CDAMO das metodologias de DIV e FIV .....	100
Tabela 6.	Média de produtos de fermentação nas metodologias <i>in vivo</i> (mmol/kg MS fecal) e <i>in vitro</i> (mmol/kg MO) .....	100
Tabela 7.	Correlação dos parâmetros fermentativos entre as metodologias <i>in vivo</i> e FIV .....	102
Tabela 8.	Equações de predição e r <sup>2</sup> dos parâmetros fermentativos com significância na correlação entre metodologias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	102

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Características digestivas do gato .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Saúde intestinal .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Aditivos alimentares em gatos .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.3.1</b>	<b>Prebióticos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.3.2</b>	<b>Parede celular de levedura (PCL).....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3.3</b>	<b>Extrato de yucca .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3.4</b>	<b>Fitoterápicos .....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Produtos de fermentação <i>in vivo</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.5</b>	<b>Digestibilidade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.6</b>	<b>Fermentação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>39</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>39</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Local de condução do ensaio.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Pré-experimento .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.2.1</b>	<b>Seleção do substrato e dose. ....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.2.2</b>	<b>Determinação da concentração do inóculo. ....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.2.3</b>	<b>Seleção do tempo de incubação .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.2.4</b>	<b>Procedimento de fermentação .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Experimento 1 .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.3.1.</b>	<b>Meio de cultura, substratos e aditivo .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.3.2</b>	<b>Análises laboratoriais .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3.2.1</b>	<b>Volume de gás na fase gasosa.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3.2.2.</b>	<b>Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S).....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3.2.3.</b>	<b>pH e amônia .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>Experimento 2.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4.1.</b>	<b>Meio de cultura, substrato e aditivos. ....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4.2.</b>	<b>Análises laboratoriais.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.3.</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>53</b>

3.4.	RESULTADOS.....	54
3.4.1.	<b>Pré-experimento.</b> .....	54
3.4.1.1	Pressão (PSI) dos substratos em diferentes concentrações. ....	54
3.4.1.2.	Efeito da diluição fecal na pressão (PSI).....	54
3.4.1.3.	Efeito do tempo de incubação na pressão (PSI). ....	55
3.4.2	<b>Experimento 1.</b> .....	55
3.4.3.	Experimento 2.....	56
3.5	<b>DISCUSSÃO.</b> .....	60
3.6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	75
	Referências .....	76
4.	<b>CAPÍTULO 3.</b> .....	84
	<b>RESUMO</b> .....	84
	<b>ABSTRACT</b> .....	86
4.1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	88
4.2.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	90
4.2.1.	Local de condução .....	90
4.2.2.	Experimento 1. Comparação da CDMS e CDMO entre o método <i>in vivo</i> e dois métodos <i>in vitro</i> .....	91
4.2.2.1.	Ensaio <i>in vivo</i> .....	91
4.2.2.2.	Digestibilidade pelo método <i>in vitro</i> sem considerar a etapa de fermentação (FIV).....	92
4.2.2.3.	Determinação do CDMS e CDMO pela DIV seguida pela etapa de fermentação <i>in vitro</i> (FIV).....	93
4.2.3.	Experimento 2. Comparativo dos produtos de fermentação das metodologias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	94
4.2.3.1.	Produtos de fermentação <i>in vivo</i> . ....	94
4.2.3.2.	Produtos de fermentação <i>in vitro</i> . ....	96
4.2.4	Análises estatística. ....	97
4.3.	<b>RESULTADOS.</b> .....	98
4.3.1.	Experimento 1. ....	98
4.3.2.	Experimento 2. ....	100
4.4	<b>DISCUSSÃO.</b> .....	102
4.5	<b>CONCLUSÕES.</b> .....	108
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	109



## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

No século passado, a nutrição animal teve papel muito importante em aspetos relacionados ao aporte de nutrientes para adequado desenvolvimento, crescimento, produção de carne, ovos e leite e pouco a pouco, começou a ser reconhecida como instrumento de promoção da saúde e bem-estar nos animais. Diferentes funcionalidades e mecanismos são relatados, dentre eles, aqueles ingredientes ditos promotores de saúde do trato gastrointestinal (TGI) pela modulação do microbiota local (NAWAZ et al., 2018).

Estudos revelam que no trato intestinal dos mamíferos, existe uma grande e complexa microbiota composta por vírus, bacterias, algas, protozoários e fungos, com uma carga total intestinal estimada de  $10^{12}$  e  $10^{14}$  microorganismos, dez vezes maior que as células do hospedeiro (SUCHODOLSKI, 2011), tendo impacto na saúde intestinal do hospedeiro. Portanto, manter uma ótima condição da microbiota e seu equilíbrio é importante para a manutenção da saúde do hospedeiro (MASUOKA et al., 2017).

Particularmente os gatos, requerem grandes teores de proteína na dieta, isso contribui para uma população de espécies bacterianas principalmente proteolíticas, como de *Clostridium spp.*, que usam como fonte de nutrientes os substratos provenientes da fermentação dos aminoácidos, trazendo como consequência a produção de vários compostos potencialmente prejudiciais como amônia, aminas biogênicas, ácidos graxos de cadeia ramificada, indol e fenol (ROCHUS; JANSSENS; HESTA, 2014). Apesar dos gatos serem considerados como carnívoros estritos, seu intestino grosso tem capacidade fermentativa de compostos de carboidratos, tornando-se importante a utilização de ingredientes que resistam à digestão. Os prebióticos possuem estas características que promovem a saúde geral do hospedeiro (BIAGI et al., 2010; BROWNAWELL et al., 2012; NAWAZ et al., 2018). Nutricionistas e pesquisadores da indústria de alimentos para animais de estimação costumam procurar ingredientes que ofereçam benefícios além da nutrição básica com efeitos positivos na saúde intestinal do animal (ROBERFROID, 2008; BIAGI et al., 2010; DE GODOY; KERR; FAHEY, 2013). Pesquisas vanguardistas, apontam para o uso em animais de estimação, a adição de compostos fitoterápicos, que tem sido, de grande

interesse na medicina e nutrição humana, mas ainda pouco estudados para cães e gatos. Neste sentido, destacam-se os óleos essenciais obtidos a partir de extratos vegetais que possuem compostos alcoólicos voláteis (WINDISCH et al., 2008) e seus efeitos podem incluir proteção contra infecções de origem parasitária e maior ação contra bactérias gram positivas, no entanto, podem apresentar efeito negativo sobre as bactérias benéficas do intestino (HOROŠOVÁ; BUJŇÁKOVÁ; KMEŤ, 2006; ZENG et al., 2015).

A compreensão do comportamento desses compostos produzidos pela digestão e fermentação de ingredientes alimentares é importante para otimizar sua aplicabilidade na nutrição de felinos, sendo prática comum o uso de animais para estes fins. No entanto, a utilização de modelos alternativos que permitam simular a fisiologia do trato gastrointestinal são uma ferramenta interessante para o teste rápido de ingredientes e que estão em concordância com a tendência mundial de reavaliar o uso de animais em experimentos. Um dos conceitos mais relevantes na experimentação com animais é o princípio dos 3Rs na experimentação animal, referindo-se aos conceitos de redução, substituição e refinamento na utilização de animais no meio científico, sugerindo que é importante considerar métodos que refinam as técnicas, visando eliminar ou minimizar a dor e estresse, que reduzam o número de animais para determinados testes, e a possível substituição e utilização de modelos que não necessitem de animais (RUSSELL; BURCH, 1959). Os modelos de digestão e fermentação do trato gastrointestinal *in vitro* possuem as vantagens de reprodutibilidade, simplicidade, universalidade e podem simular integralmente as condições *in vivo* para imitar os processos digestivos orais, gástricos, do intestino delgado e do intestino grosso (GETACHEW et al., 1998; PAYNE et al., 2012; JI et al., 2022).

A seguinte revisão tem como objetivo apresentar alguns conceitos, metodologias e processos relacionados com modelos de digestão e fermentação, trazendo metodologias *in vitro* que simulam o ambiente gastrointestinal de felinos e apresentando compostos que tem interferência nos produtos fermentativos.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Características digestivas do gato

Ao longo da história, os humanos têm sido associados com gatos de várias maneiras, incluindo proteção, controle de roedores, caça e companhia. As dietas de gatos mudaram, como resultado da domesticação, desde a caça e busca de alimento para dietas formuladas que suprem suas necessidades nutricionais específicas (BUFF et al., 2014).

Os ancestrais selvagens do gato doméstico (*Felis silvestris*) são conhecidos por serem carnívoros obrigatórios, nutricionalmente isso significa que em seu habitat natural os gatos consomem pequenas presas, incluindo roedores e pássaros, que são ricos em proteínas, moderados em gordura e incluem apenas o mínimo de carboidratos (LEGRAND-DEFRETIN, 1994). Em gatos, as necessidades dietéticas de proteína, arginina, taurina, metionina e cistina, ácido araquidônico, niacina, piridoxina, vitamina A e vitamina D são maiores do que para onívoros devido a diferenças metabólicas (MORRIS, 2002). O fato de que os gatos evoluíram consumindo presas com baixo teor de carboidratos, levou a especulações que dietas ricas em carboidratos podem ser prejudiciais à saúde felinae que o excesso de carboidratos pode levar à obesidade e/ou diabetes mellitus (VERBRUGGHE; HESTA, 2017).

Embora os gatos possam usar carboidratos como fonte de energia metabólica, eles têm particularidades quanto a sua utilização e malefícios associados ao seu consumo não foram comprovados para a espécie, sendo a inclusão de carboidratos em rações extrusadas secas importantes para o processo de expansão e cozimento deste alimento (ZORAN, 2002). Apesar dos carboidratos serem considerados nutrientes não essenciais da dieta, a glicose é uma fonte energética fisiologicamente essenciais para o cérebro, glóbulos vermelhos, leucócitos e outros tipos de células especializados como a medula renal, testículos e olhos (HOENIG et al., 2012).

Devido às pressões evolutivas, os gatos desenvolveram várias adaptações fisiológicas para digestão e absorção de carboidratos que refletem sua verdadeira natureza carnívora (MORRIS, 2002). Os gatos possuem capacidade enzimática digestiva para digerir carboidratos; semelhante aos cães, a amilase salivar responsável pelo início da digestão do amido é muito limitada, a atividade da amilase intestinal é baixa em comparação com outros animais e, além disso, gatos adultos tem

baixa atividade de maltase, apenas traços de isomaltase e nenhuma atividade de lactase e sacarase e, em relação às dissacaridases (maltase, isomaltase e sacarase), estas estão presentes na mucosa do intestino delgado felino, mas a atividade na borda em escova intestinal é baixa em comparação com outras espécies (VERBRUGGHE; HESTA, 2017). É relatado uma mínima ou ausente atividade de glicoquinase hepática em gatos que é responsável pela fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato, a primeira etapa da glicólise e também não tem nenhuma expressão do gene da glicoquinase no fígado felino (TANAKA et al., 2005). Como mecanismo compensatório possuem alta atividade gliconeogênica no fígado e as atividades de enzimas gliconeogênicas (piruvato carboxilase, frutose-1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase) são maiores daquelas achadas em fígados caninos (ROGERS; MORRIS; FREEDLAND, 1977). Apesar destas particularidades na digestão e metabolismo de carboidratos, a digestibilidade aparente do amido é de 40 a 100%, dependendo da fonte e do tratamento, o que prova que os gatos podem digerir e absorver carboidratos (VERBRUGGHE; HESTA, 2017) e apesar do baixo teor de carboidratos das dietas carnívoras, os gatos podem digerir eficientemente esse nutriente quando processado adequadamente na ração (DE-OLIVEIRA et al., 2008)

Outra classe de carboidratos complexos que não são digeridos pelo intestino delgado de gatos, são aqueles provenientes de plantas que são denominados polissacarídeos ou fibra dietética. Esta fibra é composta de polissacarídeos da parede celular (celulose, hemicelulose e algumas pectinas), polissacarídeos não celulósicos (pectinas, gomas e mucilagem) e compostos estruturais que não são polissacarídeos (lignina) (NRC, 2006). A classificação mais comum da fibra dietética é feita em dois subgrupos principais: segundo a solubilidade em água e pelo grau de fermentação (WILLIAMS et al., 2017). As características de solubilidade e fermentabilidade de fibras têm sido implicadas em suas propriedades fisiológicas; a fibra insolúvel e não fermentável pode atuar como formador de volume, aumentando a MS fecal e reduzindo a digestibilidade dos alimentos, e fontes mais solúveis e fermentáveis podem modificar a formação do produto final da fermentação (MIDDELBOSS; FASTINGER; FAHEY, 2007) A fibra dietética têm ganhado interesse na indústria de alimentos para animais de estimação, pois desempenham um papel importante na modulação do movimento intestinal, influenciam a função imunológica e o perfil da microbiota intestinal, também diluindo a densidade calórica, contribuindo para a perda de peso e, indiretamente, podendo reduzir a incidência de obesidade e diabetes

mellitus na população de animais de estimação (DE GODOY; KERR; FAHEY, 2013).

### **1.2.2 Saúde intestinal**

O TGI tem a superfície mais extensa do corpo e está constantemente exposta a uma ampla variedade de substâncias potencialmente nocivas. O TGI atua como uma barreira seletiva entre os tecidos e seu ambiente luminal. Essa barreira está composta por componentes físicos, químicos, imunológicos e microbiológicos e uma ampla gama de fatores associados à dieta e agentes de doenças infecciosas podem afetar negativamente o delicado equilíbrio (YEGANI; KORVER, 2008).

Nos últimos anos, o conceito de "saúde intestinal" está atraindo um interesse significativo entre pesquisadores e indústria, esta atenção surge do desejo de desenvolver intervenções nutricionais destinadas a modular a funcionalidade gastrointestinal em direção à promoção de saúde. No entanto, a saúde intestinal apesar de ser um tópico cada vez mais popular na nutrição animal, ainda não possui uma definição científica clara (KOGUT; ARSENAULT, 2016). Existem seis características principais para promover a saúde intestinal que são recentemente propostas: a dieta, digestão e absorção efetivas, microbiota normal e em equilíbrio, estado imunológico eficaz, mucosa intestinal e função motora e neuroendócrina normal (CELLI et al., 2018).

A composição da dieta desempenha papel fundamental na nutrição e na imunidade intestinal. Macronutrientes, vitaminas, minerais e oligoelementos, fornecem mecanismos para enfrentar os desafios nutricionais e no ambiente intestinal, na modulação da resposta inflamatória durante as doenças, podendo melhorar a saúde ou bem-estar do animal, dentre eles existe crescente evidência sobre o efeito benéfico da suplementação antioxidante na dieta para modular o equilíbrio de óxido-redução (COTTRELL et al., 2015; MCGRATH et al., 2018). Como consequência, os proprietários e a indústria de animais de estimação buscam maneiras de promover a saúde, a qualidade de vida e a longevidade de seus animais de companhia e, dessa forma, as fibras dietéticas têm ganhado interesse renovado na indústria de rações, pois desempenham papel importante na modulação e saúde intestinal (DE GODOY; KERR; FAHEY, 2013).

### 1.2.3 Aditivos alimentares em gatos

O aditivo é uma substância, microorganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não seja utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal, o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais, sendo classificados como tecnológicos, sensoriais, nutricionais e zootécnicos (WINDISCH et al., 2008). A utilização dos aditivos deve ser proposta nas quantidades estritamente necessárias à obtenção do efeito desejado, sendo obrigatório o cumprimento das condições e das restrições impostas no registro, referentes à comercialização, utilização ou manipulação do aditivo ou dos produtos que o contenham (BRASIL, 2015).

Dentre os aditivos de destaque recente para alimentação de animais de estimação destacam-se os probióticos, prebióticos, simbióticos e fitoterápicos (BIAGI et al., 2010; INNESS et al., 2011; ALAM et al., 2012; PINNA; BIAGI, 2014; SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016; BARKO et al., 2018; WERNIMONT et al., 2020).

#### 1.2.3.1 Prebióticos

Os prebióticos são definidos como compostos não digeridos pelo organismo animal que são seletivamente fermentados pelos micro-organismos do trato gastrointestinal, estimulando o crescimento e/ou a atividade de alguns destes micro-organismos capazes de prover benefícios ao hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Dentre as características para que estas substâncias sejam classificadas como prebióticas citam-se a incapacidade de digestão pelo hospedeiro (ou digestão parcial), não ser absorvível no intestino delgado, ser minimamente fermentável pelas bactérias da microbiota oral e por bactérias nocivas do TGI e a possibilidade de serem fermentadas pelos micro-organismos ditos benéficos presentes neste trato (ROBERFROID, 2008; ROBERFROID et al., 2010).

Estudos em nutrição felina, afirmam que a ingestão alimentar rica em proteínas, como é costume na dieta de gatos, contribui principalmente para o crescimento de *Clostridium spp.* fecal, e que a adição de compostos prebióticos aumenta a população de bactérias desejáveis como *Bifidobacteria spp.* (KANAKUPT et al., 2011; MONDO et al., 2019). Em relação aos produtos de fermentação, os prebióticos têm sido

estudados em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Num estudo *in vitro* (BARRY et al., 2011), com inóculo fecal felinos suplementados com FOS, foi observado aumento na produção de AGCC. Estudos relacionados (KANAKUPT et al., 2011) analisaram os efeitos do FOS sobre os produtos da fermentação observaram aumento na concentração total de AGCC e AGCR o que esteve relacionado com redução do pH das fezes. Num estudo (BARRY et al., 2010) foi avaliada a inclusão de 4% de FOS, pectina e celulose, observando aumento na concentração fecal de ácido butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e AGCR totais.

#### 1.2.3.2 Parede celular de levedura (PCL)

A PCL é comumente usada como aditivo prebiótico na dieta de animais, está formada por quitina, beta-glucanos com ligações 1-3 e 1-6 e mananoproteínas depositadas na parede externa, contendo principalmente alfa galactomananos (OSUMI, 1998). A composição da PCL é relativamente variável, conforme um estudo (FLEET; MANNERS, 1976), relata que a PCL pode possuir entre 30 e 60% de beta-glucanos, 25 a 50% de mananoligossacarídeos (MOS), 13 a 15% de proteína, 2 a 14% de lipídio e 1 a 2% de quitina. Estes polissacarídeos de PCL podem fixar patógenos e aumentar a liberação de citocinas que leva a melhora da imunidade. Além disso, a PCL pode melhorar a histologia intestinal de animais não ruminantes (MA et al., 2020)

Dentro das leveduras, a mais usada na alimentação de cães e gatos está a *Saccharomyces cerevisiae* (MIDDELBOS; FASTINGER; FAHEY, 2007; BELOSHAPKA et al., 2012; SANTOS et al., 2018; PERINI et al., 2020), que são organismos eucariotos unicelulares utilizados em diversos processos industriais, como na panificação, indústria sucroalcooleira e na produção de bebidas. No entanto, atualmente as leveduras e seus componentes não têm sido considerados subprodutos, já que para o abastecimento de mercados cada vez mais exigentes, como a indústria de alimentos para seres humanos e animal, plantas industriais têm sido projetadas exclusivamente para sua produção (SANTOS et al., 2018). Novas preparações purificadas e solúveis têm sido desenvolvidas na tentativa de aumentar suas ações biológicas (DE SOUZA THEODORO et al., 2019).

Estudos analisando a inclusão da PCL em alimentos destinados à animais de companhia avaliam seus efeitos sobre a microbiota intestinal e produtos

de fermentação (BELOSHAPKA et al., 2012; SANTOS et al., 2018; DE SOUZA THEODORO et al., 2019), encontrando diferenças que justificam sua utilização. Ao ser avaliada em relação aos efeitos sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi achado (ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, 2002) aumento da produção destes compostos e redução do pH fecal. Os principais compostos da PCL são os mananoligossacarídeos, conceituados como carboidratos estruturais isolados, sendo considerados como compostos prebióticos que têm efeitos benéficos no trato gastrointestinal, demonstrando ter o potencial de estimular bactérias benéficas ao mesmo tempo que têm um efeito negativo sobre bactérias patogênicas (por exemplo, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*) no intestino, o que pode ter um efeito positivo na saúde dos animais, provando também, ser eficaz em melhorar a eficiência energética, ao mesmo tempo que protege contra infecções impedindo a ligação de certos patógenos (CORRIGAN et al., 2011).

Existem duas localizações principais de MOS na parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*, podendo ser encontrado ligado às proteínas da parede celular com grupos oxigênio e glucosil-nitrogênio ou como elementos de polissacarídeos  $\alpha$ -D-mananose. A combinação na forma de conjugados mananoproteína é uma estrutura altamente hidrofílica que têm capacidade de fixação para vários receptores bacterianos (SPRING et al., 2015). O MOS atua como um ligante de fímbrias do tipo 1 bacterianas, resultando na redução da colonização patogênica no trato gastrointestinal, sendo relatado uma redução do patógeno oportunista *C. perfringens* nas fezes de cães alimentados com dieta suplementada com MOS. Também mostraram uma redução numérica de *E. coli* nas fezes de cães adultos alimentados com uma preparação de parede celular de levedura com alto teor de MOS. Além de diminuir a abundância de espécies patogênicas, a suplementação de MOS mostrou ter impacto benéfico na saúde intestinal, promovendo o crescimento de *Lactobacillus spp.* (VAN DEN ABBEELE et al., 2020).

### 1.2.3.3 Extrato de yucca

A *Yucca schidigera* é uma planta da família Agavaceae que contém um grupo de substâncias cuja principal função é a defesa contra predadores, como os insetos. Essas substâncias são denominadas saponinas, que são glicosídeos produzidos em grande quantidade pela planta e muito utilizados na nutrição animal. Além disso, é



utilizado como espumante e flavorizante na indústria de alimentos e, a porção saponina presente, confere propriedades detergentes e surfactantes, que determinam os seus efeitos benéficos e deletérios (ROQUE, 2009). Estas saponinas no intestino inibem a urease bacteriana responsável por converter ureia em amônia (LOWE et al., 1997) sendo também estudados outros efeitos benéficos como redução da halitose (DI CERBO et al., 2017).

A eficiência deste composto sobre a redução de gases (amônia, sulfeto de hidrogênio) e de maus odores das excretas dos animais, talvez seja um dos efeitos mais estudados (ROQUE, 2009). Foi observada redução de odor e amônia fecal em suínos e bovinos leiteiros usando um composto comercial com grande porcentagem de yucca na sua composição (AMON et al., 1995). Num estudo em gatos (ROQUE et al., 2011), não foi achada diferenças significativas na digestibilidade dos nutrientes com a inclusão de doses crescentes do extrato de yucca.

#### 1.2.3.4 Fitoterápicos

As plantas têm sido usadas em todo o mundo para fins medicinais desde que os humanos existem. Observadores de um grupo de macacos selvagens, cavalos e carnívoros relataram que esses animais comem seletivamente certas plantas ou ervas para aliviar problemas, como parasitas ou outras doenças intestinais. Ervas e plantas ainda são amplamente utilizadas em muitos grupos de pessoas que vivem mais perto da natureza. Muitas drogas modernas têm sua origem em plantas ou fungos, como atropina (*Atropa belladonna*), valeriana (*Valeriana spp.*), digitálicos (*Digitalis purpurea*), penicilina (*Penicillium spp.*) e estreptomicina (*Streptomyces griseus*) (SMITH-SCHALKWIJK, 1999) .

Há um interesse contínuo em alternativas botânicas aos medicamentos comumente usados para tratar parasitas entéricos. Os óleos essenciais de ervas e especiarias culinárias podem oferecer um caminho diferente para o tratamento do crescimento excessivo de protozoários e redução de odores (FORCE; SPARKS; RONZIO, 2000).

Outra classe de compostos fitoterápicos, ainda pouco estudada para cães e gatos, são os óleos essenciais, obtidos a partir de extratos vegetais que constituem compostos voláteis extraídos por destilação ou vaporização à álcool (WINDISCH et

al., 2008). Seus efeitos podem incluir proteção contra infecções de origem parasitária, maior ação contra bactérias gram positivas, porém podem apresentar efeito negativo contra bactérias benéficas no intestino (HOROŠOVÁ; BUJŇÁKOVÁ; KMEŤ, 2006; ZENG et al., 2015). Num estudo em humanos avaliando os efeitos antiparasitários de diferentes plantas (*Carica Papaya*, *Argemone mexicana*) e tem demonstrado efeitos contra *Toxocara canis* (RAMOS et al., 2015). Entretanto, um estudo demonstrou benefícios de óleo obtido da planta *Ficus obtusifolia kunth* (*Moraceae*) cujos extratos etanoicos presentes no fruto dessa planta reduziram significativamente a população de *Toxocara canis* e *Toxocara cati* em cães e gatos, respectivamente (QUESADA; CASTAÑO; BILBAO, 2009). Num estudo em humanos, usando óleo de orégano (*Oreganum vulgare*), encontrou que quando administrado por via oral, erradica as parasitas internas de *Entamoeba*, *Endolimax* e *Blastocystis* (FORCE; SPARKS; RONZIO, 2000).

#### **1.2.4 Produtos de fermentação *in vivo***

No gato doméstico apesar de ter um cólon curto e ter um ceco não funcional, devido as adaptações evolutivas de uma dieta estritamente carnívora, ocorre considerável fermentação microbiana no intestino posterior (ROCHUS; JANSSENS; HESTA, 2014). Além disso, pesquisas *in vivo* demonstraram que as concentrações de ácidos graxos voláteis no cólon de gatos saudáveis eram comparáveis àquelas medidas no rúmen de ruminantes e no intestino grosso de outros mamíferos monogástricos (BROSEY; HILL; SCOTT, 2000),

Dentro das limitações no uso de fibra na dieta de gatos é a diminuição da consistência fecal, que pode ter implicações para o animal hospedeiro, para a indústria de alimentos e pela escolha dos alimentos pelos tutores (ROCHUS et al., 2013). Um efeito esperado pela inclusão de fibras fermentáveis é diminuição no pH fecal causada por um aumento na produção de produtos finais bacterianos, como ácido láctico e AGCC (BROSEY; HILL; SCOTT, 2000).

Os diversos produtos fermentativos encontrados nas fezes são moléculas sintetizadas principalmente pela microbiota do intestino grosso depois da fermentação de carboidratos e proteínas. Certos carboidratos dietéticos que são fermentados pela microbiota intestinal podem ter efeitos no aumento de AGCC (acético, propiônico e butírico) (FLICKINGER et al., 2003), sendo produtos desejáveis, eles possuem várias

funções como a nutrição dos colonócitos, modulação de células do sistema imune, a ativação de células dendríticas, tendo efeitos benéficos em doenças intestinais. O ácido acético e propiônico são prontamente absorvidos e entram na corrente sanguínea, sendo fonte de energia extra para o hospedeiro, o ácido butírico é a principal fonte de energia para os colonócitos, sendo importante regulador do crescimento e diferenciação celular (SANTOS, 2018). Outro produto da fermentação com potencial benéfico que também tem sido muito estudado é o ácido láctico. O ácido láctico faz parte dos produtos intermediários da fermentação, em especial, trata-se de uma importante substância do metabolismo bacteriano, com capacidade de redução do pH e conseqüente diminuição de bactérias potencialmente patogênicas e por contribuir na síntese de AGCC (SANTOS, 2015).

A geração de compostos da fermentação não só produz substâncias benéficas ao hospedeiro. Existem produtos que tem potencial de gerar doenças ou alterações e, geralmente, são aqueles provenientes da fermentação de proteínas. Os produtos de fermentação intestinal de proteínas podem ser divididos em cinco categorias: amônia, fenóis e indóis, ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), aminas biogênicas e compostos contendo enxofre volátil nas fezes. Esses compostos são considerados putrefativos e são afetados pelas concentrações de proteínas na dieta e dos próprios aminoácidos endógenos do hospedeiro (SWANSON et al., 2002). Os AGCR, principalmente isobutirato, valerato e isovalerato, são produzidos por desaminação e descarboxilação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (LIU, 2011).

Outro produto indesejável da fermentação colônica é a amônia que é considerada um dos principais responsáveis pelo mau odor das fezes junto com as aminas biogênicas, ácidos graxos de cadeia ramificada, indóis, fenóis e compostos sulfurados voláteis (SANTOS, 2018). Também tem sido relacionada com doenças colônicas, considerada potencialmente carcinogênica pela capacidade de alterar o DNA celular (BARRY et al., 2010). A amônia pode ser produzida por bactérias a partir de proteínas e seus derivados via proteólise, degradação de peptídeos ou desaminação. No intestino grosso a principal rota é a desaminação de aminoácidos e é produzida principalmente por bactérias anaeróbias e aeróbias gram-negativas, a amônia pode estar envolvida na promoção de tumores e seu acúmulo no sangue está associado com alterações neurológicas em pacientes com doenças hepáticas (LIU, 2011).

### 1.2.5 Digestibilidade *in vitro*

A análise de digestão *in vitro*, simula as condições fisiológicas de digestão no animal principalmente nos processos que acontecem no estômago e intestino delgado, sendo uma ferramenta útil para entender as mudanças, interações e biodisponibilidade de nutrientes, medicamentos e alguns compostos não nutritivos. É uma metodologia amplamente usada, rápida, barata e reproduzível que permite conhecer fora do organismo, a transformação de alimentos em nutrientes simulando os processos físico-químicos que acontecem no lúmen digestório (GONZÁLEZ, 2016). A digestão *in vitro*, está baseada principalmente no conhecimento da fisiologia humana que é extrapolado para animais e são desenvolvidos laboratorialmente, gerando protocolos adequados para realizar os ensaios. Uma das maiores limitações das metodologias *in vitro*, é que não é possível reproduzir todos os eventos que acontecem no processo digestório *in vivo*, pelas complexas relações entre alimento e corpo, além disso, não considera as diferenças intrínsecas de cada organismo (idade, sexo, saúde, doença, genética) que influenciam o funcionamento do aparato digestório (MINEKUS et al., 2014). Normalmente nas análises de digestibilidade *in vitro*, são reproduzidas a fase gástrica e intestinal, usando fluidos que contém soluções e enzimas em quantidade adequadas para simular o processo digestório, sendo a composição e concentração de enzimas um dos aspectos mais importantes durante o desenvolvimento dos protocolos, sempre cuidando que as soluções mantenham condições ótimas como temperatura e pH (BOISEN; EGGUM, 1991). Atualmente existem diferentes modelos de digestão *in vitro* que diferem principalmente, no número e tipo de fases incluídas, na composição dos fluidos simulados (enzimas, soluções salinas, etc.), tensões mecânicas e fluxos de fluido empregados (HUR et al., 2011). Os modelos a digestão *in vitro* podem ser estáticos ou dinâmicos, os modelos estáticos são os mais utilizados, devido ao seu baixo custo e simplicidade. Neles, é utilizado um único compartimento, no qual as soluções simuladas são adicionadas manualmente dependendo os períodos de incubação/agitação estabelecidos e de cada fase, corrigindo o pH do meio. Esses tipos de modelos tem sido estudados há décadas. No entanto, esses métodos apresentam limitações, pois são incapazes de reproduzir os movimentos peristálticos do estômago e do intestino, esvaziamento gástrico ou mudanças contínuas no pH e no fluxo de secreção (GUERRA et al., 2012). Os modelos dinâmicos superam as

limitações dos modelos estáticos. Estes podem ser monocompartimentados ou bi-multicompartimentados, os bi-multicompartimentados estão compostos por dois compartimentos que buscam simular as porções anatômicas do estômago e intestinos, porém, não são capazes de reproduzir as contrações peristálticas. Existem outros modelos capazes de reproduzir movimentos peristálticos muito semelhante ao do estômago, no entanto, esses modelos apenas reproduzem a fase gástrica da digestão, e continuam apresentando limitações, pois não simulam tempo de trânsito real ou esvaziamento gástrico. Atualmente, os modelos bi e multicompartimentos oferecem as melhores alternativas que os estáticos, embora também apresentem limitações, pois não são capazes de reproduzir as interações entre corpo e nutrientes. O modelo mais realista para simular as condições de digestão *in vivo* é o “TNO gastrointestinal model 1 (TIM-1)”, é um modelo multicompartimental dinâmico controlado por computador que simula as principais funções digestivas fisiológicas do estômago e do intestino delgado (GONZÁLEZ, 2016). Estudar a correlação entre ensaios de digestão *in vitro* com ensaios *in vivo* é de vital importância. Deve-se levar em consideração que os ensaios de digestão *in vitro* não permitem a reprodução de certos eventos de digestão *in vivo*, como controle hormonal e nervoso, mecanismos de feedback, atividade das células da mucosa, movimentos peristálticos e envolvimento do sistema imunológico. Existem muitos fatores individuais que também afetam o comportamento do sistema digestório, como idade, sexo, presença ou ausência de patologias, atividade física e genética sendo esses aspectos impossíveis de serem simulados. A falta de correlação achada e estudada por diferentes grupos de pesquisas entre ensaios *in vitro* e *in vivo* em alimentação humana bem como as complicações das técnicas (HASJIM et al., 2010), destacam a necessidade de continuar pesquisando nesta área, para otimizar e validar modelos de digestão *in vitro* com ensaios de digestão *in vivo* e determinar suas limitações, usos e alcances (TORRES-ESCRIBANO et al., 2011; GUERRA et al., 2012; AUGUSTIN et al., 2014).

### 1.2.6 Fermentação *in vitro*.

Diversos autores equiparam a microbiota intestinal como um órgão independente do animal com propriedades benéficas para o hospedeiro (BOCCI, 1992; POSSEMIERS et al., 2011). No começo deste século foi identificado um conjunto de contribuições adicionais da microbiota intestinal, como fornecer alimento, regular desenvolvimento de células epiteliais e modulação da imunidade. Porém é importante ressaltar que muitas funções básicas da microbiota intestinal ainda permanecem desconhecidas (PAYNE et al., 2012).

Na essência, os modelos de fermentação intestinal *in vitro* são caracterizados pela interação de um ou vários substratos com a microbiota fecal, que são mantidos sob condições similares às fisiológicas e controladas (MACFARLANE; MACFARLANE; GIBSON, 1998). O objetivo comum dos modelos de fermentação intestinal *in vitro* é cultivar uma microbiota intestinal complexa sob condições ambientais controladas para a realização de estudos de modulação da microbiota e seu metabolismo (VERHOECKX; COTTER; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2015). Tem como características serem baratos, simples e versáteis, sendo convenientes para amostragem com alta reprodutibilidade de resultados, amplamente utilizados na avaliação de alimentos e seus componentes, como limitação desses modelos que, ainda falta um modelo *in vitro* de alta fidelidade, dinâmico, multidimensional e inteligente para que possa simular todo o processo de fermentação (JI et al., 2022).

Outras aplicações incluem avaliação de estudos onde a letalidade potencial do substrato restringe os testes *in vivo* como a biotransformação de medicamentos, substâncias tóxicas e também interações com espécies bacterianas potencialmente patogênicas (LE BLAY et al., 2009). Vários estudos tem usado uma combinação de modelos de células intestinais *in vitro* com modelos de fermentação *in vitro*, criando modelo avançado onde os produtos de fermentação podem ser aplicados diretamente nas células intestinais para avaliar a função da célula hospedeira (DÉAT et al., 2009). Apesar dos avanços no desenvolvimento de modelos *in vitro*, os estudos *in vivo* resistem à substituição absoluta. O conhecimento atual dos métodos de fermentação *in vitro* apoia o conceito que são meios importantes para estimativas laboratoriais da degradação dos alimentos e formação de compostos produzidos. Esses métodos podem medir desaparecimento de substratos, quantificar resíduos de incubação e

produtos novos originados da fermentação, biomassa microbiana e volume de gás (BLUMMEL, 1997).

Estudos de fermentação *in vivo* persistem como padrão ouro, mas em algumas espécies, principalmente aquelas consideradas como animais de estimação, é difícil continuar executando-os devido a fatores sociais e éticos que questionam à crueldade e bem-estar do animal (FENWICK; GRIFFIN; GAUTHIER, 2009).

## REFERÊNCIAS

- ALAM, M. J. et al. Bacterial community dynamics during swine in vitro fermentation using starch as a substrate with different feed additives for odor reduction. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 5, p. 690–700, 2012.
- AMON, M. et al. A farm scale study on the use of De-Odorase® for reducing odour and ammonia emissions from intensive fattening piggeries. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2–3, p. 163–169, 1995.
- AUGUSTIN, M. A. et al. Digestion of microencapsulated oil powders: In vitro lipolysis and in vivo absorption from a food matrix. **Food and Function**, v. 5, n. 11, p. 2905–2912, 2014.
- BARCO, P. C. et al. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 9–25, 1 jan. 2018.
- BARRY, K. A. et al. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978–2987, 2010.
- BARRY, K. A. et al. Adaptation of healthy adult cats to select dietary fibers in vivo affects gas and short-chain fatty acid production from fiber fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3163–3169, 2011.
- BELOSHAPKA, A. N. et al. Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. **American journal of veterinary research**, v. 73, n. 7, p. 1016–1023, 2012.
- BIAGI, G. et al. Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 1–2, p. 50–58, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.04.012>>.
- BLUMMEL, B. M. In vitro gas production : a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 77, p. 24–34, 1997.
- BOCCI, V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 35, n. 2, p. 251–260, 1992.
- BOISEN, S.; EGGUM, B. O. Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. **Nutrition Research Reviews**, v. 4, n. 1, p. 141–162, 1991.
- BROSEY, B.; HILL, R. C.; SCOTT, K. C. Gastrointestinal volatile fatty acid concentrations and pH in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 359–361, 2000.
- BROWNAWELL, A. M. et al. Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 5, p.



962–974, 2012. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.112.158147>>.

BUFF, P. R. et al. Natural pet food: A review of natural diets and their impact on canine and feline physiology. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 9, p. 3781–3791, 2014.

CELI, P. et al. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. **Animal Feed Science and Technology**, n. July, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840118302438>>.

CORRIGAN, A. et al. Effect of dietary supplementation with a *Saccharomyces cerevisiae* mannan oligosaccharide on the bacterial community structure of broiler cecal contents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6653–6662, 2011.

COTTRELL, J. J. et al. Nutritional strategies to alleviate heat stress in sheep. **Animal Production Science**, v. 55, p. 1391–1402, 2015.

DE-OLIVEIRA, L. D. et al. Effects of six carbohydrate sources on diet digestibility and postprandial glucose and insulin responses in cats. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2237–2246, 2008.

DE GODOY, M. R. C.; KERR, K. R.; FAHEY, G. C. Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 3099–3117, 2013.

DE SOUZA THEODORO, S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–19, 2019.

DÉAT, E. et al. Combining the dynamic TNO-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model: Application to the assessment of lycopene and  $\alpha$ -tocopherol bioavailability from a whole food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 23, p. 11314–11320, 2009.

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

FENWICK, N.; GRIFFIN, G.; GAUTHIER, C. Animal welfare bien-être des animaux. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 11, p. 1166–1168, 2009.

FLEET, G. H.; MANNERS, D. J. Isolation and Composition of an Alkali-soluble Glucan from the Cell Walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of general Microbiology**, v. 94, p. 180–192, 1976.

FLICKINGER, E. A. et al. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 8, p. 2008–2018, 2003.

FORCE, M.; SPARKS, W. S.; RONZIO, R. A. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 213–214, 2000.

GETACHEW, G. et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 72, n. 3–4, p. 261–281, 1998.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GONZÁLEZ, R. L. Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. **Revista doctorado UMH**, v. 2, n. 2, p. 5, 2016.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

HASJIM, J. et al. In vivo and in vitro starch digestion: Are current in vitro techniques adequate? **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3600–3608, 2010.

HOENIG, M. et al. Evaluation of long-term glucose homeostasis in lean and obese cats by use of continuous glucose monitoring. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 7, p. 1100–1106, 2012.

HOROŠOVÁ, K.; BUJŇÁKOVÁ, D.; KMEŤ, V. Effect of oregano essential oil on chicken *Lactobacilli* and *E. coli*. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 4, p. 278–280, 2006.

HUR, S. J. et al. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–12, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>>.

INNESS, V. L. et al. Use of static batch culture systems to investigate the fermentation effects of selected oligosaccharides and fibres by the canine faecal microiota. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 6, n. 1, p. 57–64, 2011.

JI, H. et al. In vitro gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 19, p. 5349–5371, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1884841>>.

KANAKUPT, K. et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1376–1384, 2011.

KOGUT, M. H.; ARSENAULT, R. J. Editorial: Gut health: The new paradigm in food animal production. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. AUG, p. 10–13, 2016.

LE BLAY, G. et al. New in vitro colonic fermentation model for *Salmonella* infection in the child gut. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 2, p. 198–207, 2009.

LEGRAND-DEFRETIN, V. Differences between cats and dogs: a nutritional view. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 53, p. 15–24, 1994.

LIU, D. In vitro evaluation of fermentation kinetics and end-product profiles of

**several substrates using cat fecal inocula.** 2011. Ghent University, 2011.

LOWE, J. A. et al. The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. **Research in Veterinary Science**, v. 63, p. 67–71, 1997.

MA, J. et al. Dietary supplementation of yeast cell wall improves the gastrointestinal development of weaned calves. **Animal Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 507–512, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.06.003>>.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S.; GIBSON, G. R. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. **Microbial Ecology**, v. 35, n. 2, p. 180–187, 1998.

MASUOKA, H. et al. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–9, 2017.

MCGRATH, J. et al. Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. **Research in Veterinary Science**, v. 116, p. 28–39, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.09.011>>.

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

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MONDO, E. et al. Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. **Open Veterinary Journal**, v. 9, n. 3, p. 253–258, 2019.

MORRIS, J. G. Idiosyncratic nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. **Nutrition Research Reviews**, v. 15, n. 01, p. 153, 2002.

NAWAZ, A. et al. The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 76, p. 272–278, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.004>>.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, n. 2–3, p. 207–233, 1998.

PAYNE, A. N. et al. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 17–25, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>>.

PERINI, M. P. et al. Duration of prebiotic intake is a key-factor for diet-induced modulation of immunity and fecal fermentation products in dogs. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2020.

PINNA, C.; BIAGI, G. The utilisation of prebiotics and synbiotics in dogs. **Italian**

**Journal of Animal Science**, v. 13, n. 1, p. 169–178, 2014.

POSSEMIERS, S. et al. The intestinal microbiome : A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 53–66, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.012>>.

QUESADA, L. F.; CASTAÑO, J. . . ; BILBAO, M. Efecto antiparasitario de los extractos etanólicos y etéreos de *Ficus obtusifolia* Kunth (Moraceae), frente a parásitos de clase nematodos (*Toxocara catis* y *Toxocara canis*). **Infectio**, v. 13, n. 4, p. 259–267, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70157-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70157-2)>.

RAMOS, I. S. et al. Actividad toxocaricida de plantas cubanas Anti-Toxocara activity of Cuban plants. **Revista cubana de medicina tropical**, v. 67, n. 3, p. 1–14, 2015.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. SUPPL.2, 2010.

ROBERFROID, M. B. **Prebiotics: Concept, definition, criteria, methodologies, and products Handbook of Prebiotics**, 2008. .

ROCHUS, K. et al. Highly viscous guar gum shifts dietary amino acids from metabolic use to fermentation substrate in domestic cats British Journal of Nutrition. **British Journal of Nutrition**, n. 109, p. 1022–1030, 2013.

ROCHUS, K.; JANSSENS, G. P. J.; HESTA, M. Dietary fibre and the importance of the gut microbiota in feline nutrition: A review. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 2, p. 295–307, 2014.

ROGERS, Q. R.; MORRIS, J. G.; FREEDLAND, R. A. Lack of hepatic enzymatic adaptation to low and high levels of dietary protein in the adult cat. **Enzyme**, v. 22, n. 5, p. 348–356, 1977.

ROQUE, N. C. **NÍVEIS DE ZEÓLITA ( CLINOPTILOLITA ) E *Yucca schidigera* EM RAÇÕES DE GATOS ADULTOS**. 2009. Federal de Lavras, 2009.

ROQUE, N. C. et al. Increasing levels of zeolite and yucca schidigera in diets for adult cats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2471–2475, 2011.

RUSSELL, W. M. .; BURCH, R. . **Principle of Human Experimental Techniques** London Butler and Tanner, , 1959. .

SANTOS, J. P. F. **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

SANTOS, J. P. F. et al. Effects of dietary yeast cell wall on faecal bacteria and fermentation products in adult cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 4, p. 1091–1101, 2018.

SANTOS, K. de M. **Efeitos da inclusão de teores crescentes de prebióticos nas**

**dietas de cães adultos sobre parâmetros digestivos, fermentação fecal, microbiota e imunidade.** 2018. Universidade de São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-31012018-113943/>>.

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? **Veterinary Medicine and Science**, v. 2, n. 2, p. 71–94, 2016.

SMITH-SCHALKWIJK, M. J. Veterinary phytotherapy: An overview. **Canadian Veterinary Journal**, v. 40, n. 12, p. 891–892, 1999.

SPRING, P. et al. A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, n. April 2016, 2015.

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

SWANSON, K. S. et al. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannan oligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function and Fecal Odor Components in the Canine. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1717S-1719S, 2002.

TANAKA, A. et al. Comparison of expression of glucokinase gene and activities of enzymes related to glucose metabolism in livers between dog and cat. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 6, p. 477–485, 2005.

TORRES-ESCRIBANO, S. et al. Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 3, p. 604–611, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.021>>.

VAN DEN ABEELE, P. et al. Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. **Journal of animal science**, v. 98, n. 6, p. 1–10, 2020.

VERBRUGGHE, A.; HESTA, M. Cats and carbohydrates: The carnivore fantasy? **Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1–22, 2017.

VERHOECKX, K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I. In vitro fermentation models: General introduction. In: CHAM, C. (Ed.). **The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models**. 1. ed. [s.l: s.n.]p. 275–279.

WERNIMONT, S. M. et al. The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–24, 2020.

WILLIAMS, B. A. et al. Gut fermentation of dietary fibres: Physico-chemistry of plant

cell walls and implications for health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. E140–E148, 2008.

YEGANI, M.; KORVER, D. R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, v. 87, n. 10, p. 2052–2063, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008-00091>>.

ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, 2015.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T. Waltham International Symposium : Pet Nutrition Coming of Age Intestinal Effects of Mannanligosaccharides , Transgalactooligosaccharides , Lactose and Lactulose in Dogs 1. **The Journal of nutrition**, v. 132, p. 1682–1684, 2002.

ZORAN, D. L. The carnivore connection to nutrition in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 11, p. 1559–1567, 2002.

## 2. OBJETIVO GERAL

A presente tese teve por objetivos avaliar a fermentabilidade *in vitro* com inoculo fecal felino de aditivos utilizados na nutrição de gatos, bem como comparar os métodos *in vivo* e *in vitro* para determinação da digestibilidade e produtos de fermentação de rações para gatos.

### 3. CAPÍTULO 2.

#### **Fermentação *in vitro* de aditivos prebióticos e um blend comercial empregando-se inóculo fecal de gatos adultos**

Fernando González<sup>1</sup>, Márcia Gomes<sup>1</sup>, Ricardo Vasconcellos<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo, Av. Prof. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP, 13690-970, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Av. Prof. Colombo, 5.790, Maringá, PR 87020-900, Brasil

\* Correspondência: ricardo.souza.vasconcellos@gmail.com

#### RESUMO

A fermentação *in vitro* (FIV) é uma metodologia que simula o processo fermentativo da microbiota que ocorre no intestino grosso e permite avaliar ingredientes alimentares. O objetivo deste estudo foi padronizar a metodologia de FIV e determinar o comportamento fermentativo de mananoligossacarídeos (MOS), fructoligossacarídeos (FOS), galactoligossacarídeos (GOS), extrato de yucca e carvacrol associados num blend e de forma isolada para cumprir com o objetivo foram desenvolvidos um pré-experimento e dois experimentos. O pré-experimento determinou o médio de cultura, quantidade de substrato, diluição do inóculo e tempo de incubação da FIV, No experimento 1 foi avaliado como aditivo um blend comercial contendo MOS, extrato de yucca e carvacrol em doses de 16, 32, 48, e 64 mg para cada frasco de fermentação, sendo determinados volume de gás, amônia, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e pH, sendo usado como substrato para cada frasco, pectina ou celulose ou mix de aminoácidos No experimento 2, foram determinados volume de gás, H<sub>2</sub>S, amônia, lactato, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) e pH, foi usado como substrato de FIV uma ração padrão para gatos previamente digerida *in vitro* (DIV), sendo testados como aditivos isolados o extrato de yucca, celulose, pectina, carvacrol, e oligossacarídeos (FOS, MOS, GOS) e o blend comercial do experimento 1, em doses de inclusão de 5, 10, 20 e 40 mg/frasco. O pré-experimento padronizou o meio de fermentação (WILLIAMS et al., 2005a) modificado, usando substrato em 0,2 gramas por frasco, com diluição de fezes (10:1) e tempo de incubação de 24 horas,. Para o experimento 1, o blend comercial nas doses 32, 48 e 64 mg/frasco, apresentou diminuição no H<sub>2</sub>S em todos os substratos. Para amônia, nos substratos celulose e aminoácidos houve uma diminuição de amônia nas doses de 48 e 64 mg/frasco. No experimento 2, a produção



de gás e AGCC para a pectina, blend comercial e oligossacarídeos, tiveram as maiores respostas de produção nas doses altas de inclusão, a pectina e GOS apresentaram diminuição do H<sub>2</sub>S nas doses de 40 mg/ frasco. O carvacrol e oligossacarídeos, apresentaram baixos níveis de amônia com a inclusão da maior dose dos aditivos. A pectina e oligossacarídeos tiveram as maiores produções de AGCC e baixas de AGCR na dose de 40 mg/frasco. Houve diferenças entre aditivos e níveis, indicando a grande variação entre ingredientes e que não devem ser feitas suposições quanto à fermentabilidade dos compostos usando metodologias in vitro.

**Palavras-chave:** 1; Amônia 2; ácidos graxos de cadeia curta 3; digestibilidade in vitro 4; produtos fermentação 5; Sulfeto de hidrogênio

## **In vitro fermentation of prebiotic additives and a commercial blend using fecal inoculum from adult cats**

Fernando González<sup>1</sup>, Márcia Gomes<sup>1</sup>, Ricardo Vasconcellos<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP) – São Paulo, Av. Prof. Prof. doctor Orlando Marques de Paiva, 87, Sao Paulo, SP, 13690-970, Brazil

<sup>2</sup> Department of Animal Science, State University of Maringá, Maringá, Av. Prof. Colombo, 5790, Maringá, PR 87020-900, Brazil

\* Correspondence: ricardo.souza.vasconcellos@gmail.com

### **ABSTRACT**

In vitro fermentation (IVF) is a methodology that simulates the fermentation process of the microbiota that occurs in the large intestine and allows the evaluation of food ingredients. The objective of this study was to standardize the IVF methodology and determine the fermentative behavior of oligosaccharides [mannanoligosaccharides (MOS), fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS)], yucca extract and carvacrol associated in a commercial blend and in isolation from its components. The study was development in pre-experiment and two experiments. The pre-experiment determined the culture medium, substrate amount, inoculum dilution and incubation time. In experiment 1, a commercial blend containing MOS, yucca extract and carvacrol at doses of 16, 32, 48, and 64 mg for each fermentation flask, being determined volume of gas, ammonia, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and pH, being used as substrate for each flask, pectin or cellulose or amino acids mix. In experiment 2, gas volume, H<sub>2</sub>S, ammonia, lactate, short-chain fatty acids (SCFA), branched-chain fatty acids (BCFA) and pH were evaluated, a standard cat food previously digested in vitro (IVD) was used as IVF substrate, being tested as additives yucca extract or cellulose or pectin or carvacrol, and or oligosaccharides (FOS, MOS, GOS) and the commercial blend of experiment 1, at inclusion doses of 5, 10, 20 and 40 mg/flask. The pre-experiment standardized the fermentation medium (WILLIAMS et al., 2005a) modified, using substrate at 0.2 grams per flask, with dilution of feces (10:1) and incubation time of 24 hours. For experiment 1, the commercial blend at doses of 32, 48 and 64 mg/flask showed a decrease in H<sub>2</sub>S in all substrates. For ammonia, in cellulose and amino acid substrates, there was a decrease in ammonia at doses of 48 and 64 mg/flask. In experiment 2, the production of gas and SCFA for pectin, commercial blend, and oligosaccharides, had the highest production responses at high doses of inclusion. Pectin and GOS showed a decrease in H<sub>2</sub>S at doses of 40 mg/flask. Carvacrol and oligosaccharides showed low levels of ammonia with the inclusion of the highest dose of additives. Pectin and oligosaccharides had the highest SCFA productions and

lowest BCFA yields at the dose of 40 mg/flask. There were differences between additives and levels, indicating the wide ingredient's variation and that no assumptions should be made regarding the fermentability of compounds using in vitro methodologies.

Keywords: 1; Ammonia 2; short chain fatty acids 3; in vitro digestibility 4; fermentation products 5; hydrogen sulfide

### 3.1. INTRODUÇÃO

O interesse pelos processos de fermentação do trato digestório dos monogástricos está crescendo dada a importância para a saúde do trato gastrointestinal (TGI) e do próprio animal (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001). Os processos fermentativos podem ter consequências positivas e negativas que dependem do substrato disponível para a fermentação: carboidratos ou substâncias proteicas. Sabe-se que a fermentação de carboidratos leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são importantes promotores de saúde intestinal; no entanto, a fermentação da proteína resulta principalmente em ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003; WONG et al., 2006; PÉREZ-BURILLO et al., 2019; RIOS-COVIAN et al., 2020), em menor proporção AGCC (VITAL; HOWE; TIEDJE, 2014; BUI et al., 2015; LOUIS; FLINT, 2017) e frequentemente tem liberação de outros compostos potencialmente tóxicos como aminas biogênicas, enxofre, fenóis e indóis (SWANSON et al., 2002; JANNINK et al., 2020). Foi observado (COLLINS et al., 2001), que gases contendo enxofre, principalmente o sulfeto de hidrogênio, são os principais determinantes do mau cheiro de fezes e flatos caninos e além de estar envolvido com mau odor fecal, sua presença em níveis altos (>1000 ppm) gera alteração nos colonócitos, danos no DNA, inibe a citocromo C oxidase e a oxidação do butirato (SINGH; LIN, 2015), não entanto, é pouco estudada a composição dos gases de fermentação, sendo frequentemente determinados apenas o volume de gás como um único componente fermentativo (SUNVOLD et al., 1995; RYMER et al., 2005; BARRY et al., 2011; BOSCH et al., 2017a; DANIELSSON et al., 2017). Outro produto indesejável da fermentação intestinal é a amônia, também considerada um dos compostos principais responsáveis pelo mau odor das fezes (SANTOS, 2015) e relacionada com doenças no cólon, é considerada potencialmente carcinogênica pela capacidade de alterar o ácido desoxirribonucleico celular (BARRY et al., 2010). A amônia pode ser produzida por bactérias a partir de proteínas e seus derivados via proteólise, degradação de peptídeos ou desaminação e seu acúmulo no sangue está associado a doenças neurológicas em pacientes com doenças hepáticas (LIU, 2011).

Dentro das estratégias para diminuir a produção de compostos indesejáveis da fermentação está a inclusão de prebióticos (BARRY et al., 2010; DE GODOY; KERR; FAHEY, 2013; GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; DOS SANTOS FELSSNER

et al., 2016) e aditivos vegetais redutores de odor (KUCUKKURT et al., 2008; ROQUE et al., 2011; PINNA et al., 2017), em quantidades apropriadas induzem efeitos benéficos como redução no pH intestinal, aumento da diversidade da microbiota com predominância de microorganismos benéficos e redução de compostos de fermentação protéica (BARRY et al., 2010; KANAKUPT et al., 2011).

Para determinar a presença de produtos de fermentação, os estudos nutricionais no organismo são considerados o “padrão ouro”, esta metodologia *in vivo* é difícil de realizar devido ao alto investimento para os estudos e das considerações sociais e éticas que limitam os procedimentos invasivos para acessar o intestino grosso, tornando os estudos limitados principalmente a análises de amostras fecais. A maior consciência da importância do bem-estar animal, busca iniciativas para introduzir novas metodologias que limitem o emprego de animais na experimentação aplicando os princípios dos 3Rs (do inglês, *replacement, refinement, reduction*), que em português seria substituição, refinamento e redução (KENDRICK et al., 2020). Surgindo como alternativas os métodos *in vitro* que substituem ao organismo e simulam processos de digestão e fermentação amplamente utilizados para estudar o comportamento gastrointestinal de alimentos. Os métodos *in vitro* têm a vantagem de serem mais rápidos, menos caros, menos trabalhosos e não possuem restrições éticas, isso permite que um número relativamente grande de amostras seja medido em paralelo (MINEKUS et al., 2014).

Os métodos de digestão simulada incluem tipicamente as fases gástrica e do intestino delgado e tentam mimetizar as condições fisiológicas *in vivo*, levando em consideração a presença de enzimas digestivas e suas concentrações, pH e tempo de digestão, entre outros fatores (HUR et al., 2011). O processo de fermentação *in vitro* (FIV) no intestino grosso permite maior controle do processo e aceita a triagem de muitas substâncias (ingredientes alimentares, patógenos, drogas, compostos tóxicos ou radioativos) em dose altas ou potencialmente prejudiciais ao organismo e avalia como elas são alteradas pela microbiota, (MCBURNEY; THOMPSON, 1987; VERHOECKX; COTTER; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2015). A versatilidade desta técnica permite medir diferentes compostos resultantes da interação substrato e microbiota avaliando possíveis efeitos na saúde e doença, também tem sido estudada em diferentes espécies animais a influência de vários nutrientes fermentáveis na geração de mal odor fecal pela presença de produtos fermentados que volatilizam (AMON et al., 1995; SWANSON et al., 2002; GIFFARD et al., 2006; ROQUE et al., 2011).

Embora os experimentos *in vitro* sejam úteis, existem limitações da metodologia como não conseguir representar a fermentação que pode começar em outros locais do trato gastrointestinal, não imita os processos secretórios intestinais e a não interação com o hospedeiro (LIU, 2011)

O objetivo do presente estudo foi: 1 avaliar por fermentação *in vitro* o efeito de uma mistura comercial contendo mananoligossacarídeos, extrato de yucca e óleo essencial de orégano nos produtos de fermentação usando inóculo fecal de gatos. 2) avaliar a fermentação *in vitro* dos prebióticos mananoligossacarídeos, fructoligossacarídeos, glicoligossacarídeos, dos aditivos carvacrol e extrato de yucca schidigera e um blend comercial contendo alguns na sua mistura alguns desses compostos a partir de diferentes substratos e inóculo fecal de felinos,

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Local de condução do ensaio

O estudo foi conduzido no gatil experimental (CEENUFEL) do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos Domésticos do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (DZO - UEM, Maringá-PR, Brasil) e no Laboratório de Nutrição de Ruminantes de Corte do DZO - UEM.

### 3.2.2. Pré-experimento

Para realizar os objetivos propostos foi desenvolvido um pré-experimento com a finalidade de padronizar a metodologia de FIV. O processo de padronização levou várias etapas com o objetivo de testar cada fator relacionado à FIV de forma isolada e determinar a melhor resposta.

#### 3.2.2.1. Seleção do substrato e dose.

Foi usado para o experimento o meio de cultura descrito por Williams et al., (2005a) desenvolvido para estudos em monogástricos e modificado pela não inclusão de sulfeto de sódio nano hidratado como reagente redutor e com dose da L-cisteína de 0,25 g/l (ALAM et al., 2012) e a troca da solução de minerais traços por uma solução mineral comercial (Trace metal mix with Co, Sigma-Aldrich, Alemanha) ao 1,4% numa solução 0,02 molar de HCl. Foram escolhidos três substratos por suas diferentes características fermentativas: 1) mix de aminoácidos (SuZhou Bio-Tech, China) como fonte de aminoácidos e nitrogênio, 2) Pectina (Pectin, Zio Chemical, China) fonte de fibra fermentável, 3) Celulose (Celulose, Zio Chemical, China), fonte de fibra pobremente fermentável e usada como controle negativo de fermentação, na tabela 1 está a composição química dos substratos usados. Os substratos foram testados em 4 diferentes níveis (50, 100, 200 e 400 mg) por frasco de fermentação.

#### 3.2.2.2. Determinação da concentração do inóculo.

Para a formação do inóculo, o primeiro passo foi a coleta fecal onde seis gatos

foram adaptados numa dieta padrão sem prebióticos 30 dias antes das coletas, todos adultos entre machos e fêmeas, localizados em seu ambiente natural e saudáveis. Utilizou-se uma metodologia (ROCHUS et al., 2013), em que foram coletadas fezes frescas de forma estéril por defecação espontânea de apenas três animais doadores. No máximo 3 horas depois que a primeira amostra foi coletada, as amostras foram levadas ao laboratório para formar o inóculo fecal, onde as fezes foram diluídas em soro fisiológico (9 g/l NaCl) a 39°C em duas concentrações: 1) relação 1:5 (p/v), 2) relação 1:10 (p/v).

### 3.2.2.3 Seleção do tempo de incubação

Os frascos já formados com meio de fermentação, substrato e inóculo, foram levados a incubação numa estufa (SL 100/64, Solab, Piracicaba, Brasil) a 39°C em quatro tempos de 6, 12, 18 e 24 horas.

### 3.2.2.4 Procedimento de fermentação

Para o inóculo fecal, as fezes foram coletadas por defecação espontânea e colocadas de forma asséptica em tubos Falcon de 50 ml esterilizados e preenchidos com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Os frascos com as fezes foram mantidos numa garrafa de térmica para o transporte sob temperatura constante de 39° C, no laboratório as fezes coletadas formaram um *pool* fecal e foram diluídas em solução salina fisiológica estéril (9 g/l NaCl) previamente colocada numa corrente de CO<sub>2</sub> em temperatura de 39 °C sendo homogeneizado por 60 segundos usando um misturador manual sempre sob uma corrente de dióxido de carbono mantendo as condições de esterilidade, o conteúdo homogeneizado foi filtrado através de gaze estéril de quatro camadas, 16 fios por cm<sup>2</sup> (BOSCH et al., 2017b) e o líquido resultante (desprezando a parte sólida) foi utilizado como inóculo fecal nos frascos de fermentação. Cinco mililitros do inóculo foram adicionados no frasco de fermentação de 120 mL tipo penicilina com 82 mL do meio de fermentação contendo o substrato e dose específicos para cada teste, o frasco foi preparado por antecipado o dia anterior e nas condições relatadas na metodologia (WILLIAMS et al., 2005a) e complementado pela hidratação do substrato em 4°C (GUEVARA et al., 2008); antes da inoculação, os frascos foram aquecidos em estufa por 1 hora para atingirem a temperatura de 39 °C, depois da inoculação o frasco



foi purgado novamente por 5 minutos com CO<sub>2</sub> sendo posteriormente vedado hermeticamente com rolha de borracha e selo de alumino para serem colocados em estufa preaquecida a temperatura de 39°C deixando em incubação pelo tempo de cada teste. Todas as análises foram realizadas em triplicata e para cada teste, dois frascos foram mantidos sem substrato (brancos).

Após o período de incubação, o parâmetro fermentativo usado para medir a resposta, foi a pressão de gás (PSI) do frasco de fermentação com o auxílio de um manômetro de pressão (Série 110-50R 80/20 P, Salvi, SP-Brasil), acoplado de forma hermética a uma agulha hipodérmica 18G 1,60x 40, a qual foi usada para atingir a fase gasosa do frasco de fermentação.

### **3.2.3. Experimento 1**

#### **3.2.3.1. Meio de cultura, substratos e aditivo**

Foram usadas as condições melhor obtidas no pré-experimento, o meio de cultura de Williams et al., 2005, modificado pela não adição de sulfato de sódio nano hidratado e como minerais traço foi empregada uma solução mineral comercial (Trace metal mix with Co, Sigma-Aldrich, Alemanha) ao 1,4% numa solução 0,02 molar de HCl, foram empregados 5 mL do inóculo fecal para cada frasco de fermentação numa relação fezes: solução salina fisiológica de 1:10 (p/v), com tempo de incubação de 24 horas e nível de substrato de 200 mg por frasco de fermentação. Neste meio de fermentação foi avaliado como aditivo um blend comercial (Advantage Pet Biobalance FT, Alltech, Brazil) empregado em diferentes quantidades (0,16, 32, 48 e 64 mg) por frasco, a tabela 1 apresenta a composição química dos substratos e aditivo. Dos substratos, foram usados apenas 200 mg de qualquer um dos seguintes compostos por frasco: Mix de aminoácidos (SuZhou Bio-Tech, China) ou Pectina (Pectin, Zio Chemical, China) ou Celulose (Celulose, Zio Chemical, China) O objetivo principal com este experimento foi verificar o comportamento do aditivo quando submetido a diferentes substratos de fermentação num delineamento fatorial 3 x 5, três substratos fermentativos e cinco dose do aditivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 1. Composição química analisada dos substratos e aditivo fermentativos usados na fermentação *in vitro*

Nutriente	Pectina	Aminoácidos*	Celulose	Aditivo**
Umidade (%)	9,2	0,4	4,26	5,4
Proteína bruta (%)	2,2	97,5	0,16	23,19
Extrato etéreo (%)	0,3	0,2	0,3	0,2
Fibra bruta (%)	9	0	93	3,3
Cinzas (%)	2,0	0	0	14,3
Extrato não nitrogenado (%)	77,3	2,1	2,28	53,61
Matéria orgânica (%)	98	100	100	85,7
Energia bruta (kcal/kg)	3330	4558	3851	3563

Fonte: González (2021)

\* Aminoácidos por 530 gramas: 113 g de L-leucina, 56 g L-valina, 56 g L-isoleucina, 30 g L-triptofano, 23 g L-tirosina, 100 g L-arginina, 71 g L-glicina, 23 g L-alanina, 20 g L-glutamina, 19 g L-lisina, 19 g L-aurina.

\*\* Composição: mananoligossacarídeos (2,50%), beta-glucanos (0,58%), extrato de yucca, carbonato de cálcio, proteínato de zinco, dióxido de silício, óleo essencial de orégano.

### 3.2.3.2 Análises laboratoriais

#### 3.2.3.2.1 Volume de gás na fase gasosa

Após 24 hs de incubação, foi mensurada a produção total de gás com o auxílio de um manômetro de pressão (Série 110-50R 80/20 P, Salvi, SP-Brasil), acoplado de forma hermética a uma torneira de três vias e uma agulha hipodérmica 18G 1,60x 40, a qual foi usada para penetrar no frasco pela tampa de borracha e acessar a fase gasosa. O valor medido de pressão (PSI) foi transformado para volume (mL) usando a seguinte equação:

$$y = 3,7011x - 3,5724$$

onde: y = volume de gás a 39°C, x = pressão na fase gasosa (PSI), com valor de R<sup>2</sup> = 0,9923.

Esta curva padrão foi construída usando seis diferentes frascos de fermentação com 87 ml de água destilada, nos quais foram inseridos na fase gasosa, quantidades conhecidas de ar em doses crescentes e mantidos em estufa a 39°C por três horas, sendo medida no manômetro de pressão o valor (PSI) depois desse tempo em cada frasco.

#### 3.2.3.2.2. Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

Foi coletada uma amostra da fase gasosa (0,9 mL) em 5 mL de uma solução de acetato de zinco 1% previamente colocada numa seringa de 5 mL (BD, Plastipack, Brasil), posteriormente homogeneizada em vortex (EW-04726-01, Cole-Palmer, EUA)

por 3 segundos a 2000 rpm, o líquido foi colocado em frasco de vidro de 20 mL e analisado pela metodologia de azul de metileno usando um kit comercial (Spektro Kit Sulfeto, Alfakit, Brasil) e após de 10 minutos de repouso, os resultados foram obtidos por espectrofotometria de luz visível (Evolution 220, TermoFischer, USA) em comprimento de onda de 660 nm e cubeta de 1 cm. O valor medido de absorvância (nm) foi transformado para mg/L usando a seguinte equação:

$$y=(0,0219*x)-0,0018$$

onde:  $y = \text{H}_2\text{S mg/l}$ ,  $x = \text{Absorvância a 660 nm}$ . Valor de  $R^2 = 0,9704$

Para determinar a curva padrão foi usada uma solução comercial de sulfeto de hidrogênio de 1000 mg/L (Sulfeto, Alfakit, Brazil) medindo seis pontos diferentes numa faixa entre 0,025 e 0,8 mg de  $\text{H}_2\text{S} /\text{L}$  com absorvância de 660 nm, ajustando a curva por uma equação linear.

#### 3.2.3.2.3. pH e amônia

Para medir pH, da fase líquida foram coletados 20 mL e colocados num recipiente plástico hermético, levado a refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ) por uma noite, sendo mensurado posteriormente em temperatura ambiente, usando um pHmetro digital (AK90, Asko, Rio grande do Sul, Brasil). Para determinar amônia, foi seguida a metodologia de espectrofotometria (HOUDIJK, 1998) da seguinte maneira: foi coletada uma amostra de 10 mL da fase líquida sendo adicionado 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% deixando em repouso por 30 minutos, foi centrifugado a 1000 forças centrífugas relativas (RCF) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado num tubo Falcon de 15 mL e mantido sob refrigeração até o momento da análise. Para a análise foi pipetado 0,1 mL de amostra e diluída em 1,6 mL de água destilada, adicionando 1,5 mL de solução fenol agitando imediatamente em vortex e finalmente 1,5 mL de solução hipoclorito de sódio com agitação no vortex esperando 15 minutos para fazer a leitura. A leitura foi feita por espectrofotometria de luz visível (Evolution 220, TermoFischer, USA) em comprimento de onda de 630 nm com cubeta de 1 cm. O valor medido de absorvância (nm) foi transformado para volume ( $\mu\text{mol/L}$ ) usando a seguinte equação:

$$y = 2,2065x - 0,3565$$

onde,  $y = \text{NH}_3 (\mu\text{mol/L})$ ,  $x = \text{absorvancia a 630 nm}$ . Valor de  $R^2 = 0,9895$

Para determinar a curva padrão foi usada uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,63%

medindo seis pontos diferentes em absorvância de 630 nm, ajustando a curva por uma equação linear.

### 3.2.4. Experimento 2.

O objetivo deste experimento foi determinar produtos de fermentação *in vitro* o usando como aditivo o blend comercial (Advantage Biobalance PT, Alltech, Brasil), ou seus compostos isolados (mananoligossacarídeos, carvacrol e extrato de yucca) e GOS, FOS, empregando como substrato o resíduo de uma ração padrão obtido após processo de digestão *in vitro*. Para este experimento foram desenvolvidos dois experimentos num planejamento fatorial 4 x 4 tendo como variável resposta a diferença entre o resultado e o controle.

#### 3.2.4.1. Meio de cultura, substrato e aditivos.

O meio de fermentação e procedimento de foram os mesmos do experimento 1. Como substrato foi o resíduo de uma ração padrão para gatos adultos sem a inclusão de prebióticos nem fitoterápicos (Tabela 2) após de digestão *in vitro* (MEINERI et al., 2021); modificada pela não adição do cloranfenicol: em resumo, a ração foi moída em moinho de bola, pesada (0,5 +- 0,01 g) e colocadas em sacos de filtro (5 x 5 cm) de TNT de 80 gramas e deixando os sacos já formados dentro das jarras incubadoras do aparelho TE150 (Tecnal, Piracicaba, Brasil), mantendo as soluções, dosagens e tempos da metodologia de digestão *in vitro* (HERVERA et al., 2007) que consta de duas fases, a primeira gástrica, que emprega para cada 0,5 gramas de ração, 17 mL de tampão fosfato (0.1M, pH 6), 6,7 mL de HCl (0.2M) e 24340 U de pepsina (*Pepsine from porcine gastric mucosa*, Sigma-Aldrich, Alemanha), em pH 2 e mantendo as jarras no aparelho a 39°C x 2 horas, e a segunda fase uma intestinal, onde são adicionados 6,7 ml de tampão fosfato (0.2 M, pH 6.8), 3,3 ml de NaOH (0.6 M), 66,7 mg de pancreatina (*Pancreatine from porcine pâncreas*, Sigma-Aldrich, Alemanha) a pH 6.8, numa temperatura de 39°C por 4 horas. Depois os sacos foram lavados com água, álcool metílico e acetona e os sacos foram levados a estufa de ventilação forçada (55°C) por uma noite e posteriormente foram secados em estufa (105°C). Posteriormente, os sacos foram pesados e o resíduo coletado que formou o substrato da fermentação *in vitro*, do resíduo foi determinando a MS (método 935.29),

a matéria mineral (MM, método 942,05) e a matéria orgânica (MO, como porcentagem da diferença entre MS-MM) (AOAC, 2005).

Tabela 2. Composição química analisada do alimento extrusado usado para formar o substrato da fermentação *in vitro*.

Nutriente	Ração
Umidade (%)	6,67
Proteína bruta (%)	33,56
Extrato etéreo (%)	11,14
Fibra bruta (%)	3,66
Cinzas (%)	6,17
Extrato não nitrogenado (%)	38,8
Matéria orgânica (%)	93,83
Energia bruta (kcal/kg)	4453

Fonte: González (2022)

Foram usados oito aditivos: Pectina (Pectin, Zio Chemical, China); Celulose (Celulose, Zio Chemical, China); Advantage Biobalance PT (Alltech, Brasil); Extrato de *yucca schidigera* (Tectron, São Paulo, Brasil); MOS (YesSinergy, Campinas, Brasil); FOS; (YesSinergy, Campinas, Brasil); GOS; (YesSinergy, Campinas, Brasil); Carvacrol (YesSinergy, Campinas, Brasil), testados em diferentes níveis (5, 10, 20 e 40 mg por frasco). Todas as análises foram realizadas em triplicata e dois frascos de cada substrato foram mantidos sem aditivo (controle). A tabela 3 apresenta as porcentagens de MS e MO do resíduo e aditivos.

Tabela 3. Matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO) dos aditivos e o resíduo da ração após da digestão *in vitro*.

Substrato/Aditivo	MS (%)	MO (%)
Pectina	88,80	98,04
Celulose	94,29	99,83
Biobalance	91,40	83,78
Extrato yucca	93,35	90,04
MOS	92,47	91,65
FOS	92,87	95,61
GOS	92,56	95,42
Carvacrol	99,85	99,89
Resíduo ração	91,92	96,73

Fonte: González (2021)

### 3.2.4.2. Análises laboratoriais

Os parâmetros fermentativos foram analisados da mesma forma que o Experimento 1; embora, para o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), os 5 mL da seringa contendo acetato de zinco 1% com gás após da coleta, foi armazenado em tubo Falcon de 15 mL a 4°C por um período não maior a 4 dias (HOVELL et al., 2007). Além disso, foi analisado o lactato da seguinte forma: foram coletados 6 mL da fase líquida do frasco de fermentação, centrifugado por 5 minutos em 3000 rpm. O sobrenadante foi preservado e o sedimento desprezado. Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer em tubo Falcon de 15 mL (-15°C). A análise do ácido láctico ocorreu segundo método descrito por Pryce (PRYCE, 1969) modificado pelo não emprego do ácido fosfórico como precipitante de proteína, utilizou-se espectrofotometria (Evolution 220, TermoFischer, USA) com comprimento de onda de 565nm e branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro. As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%.

O valor medido de absorvância (nm) foi transformado para concentração (µmol/L) usando a seguinte equação polinomial de 2º ordem:

$$y = -0,075x^2 + 0,112X + 0,0004$$

onde, y = Lactato (µmol/L), x = absorvância a 565 nm e com valor de R<sup>2</sup> = 0,998.

### 3.3.3. Análise estatística.

A normalidade dos dados foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para o pré-experimento 1 foram analisados os níveis do substrato pela análise de variância e teste pos hoc de Tukey (Statistica 14, Tibco Software, California, EUA). Para o experimento 1, os dados tiveram um planejamento fatorial 3x5 com 3 réplicas e foram analisados entre níveis do aditivo e substratos por análise de variância com e posterior teste de Tukey. O experimento 2, foi desenvolvido em dois tempos separados com fatoriais 4x4 usando como variável resposta a diferença entre o valor observado e a média do controle, foi empregada uma análise de variância com posterior teste de Tukey para níveis do aditivo e substratos. Valores de p ≤ 0,05 foram considerados significativos

### 3.4. RESULTADOS.

#### 3.4.1. Pré-experimento.

##### 3.4.1.1 Pressão (PSI) dos substratos em diferentes concentrações.

As pressões dos frascos de fermentação empregando os substratos em diferentes concentrações é apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Produção de gás (PSI) dos substratos em diferentes concentrações (g) com 24 horas de incubação

Substrato	0,05	0,1	0,2	0,4	Média	EPM*	Valor p**
Celulose	3,07	2,90	3,17	3,07	3,050	0,055	0,752
Pectina	7,07 <sup>c</sup>	9,73 <sup>b</sup>	12,93 <sup>a</sup>	F/F	9,911	3,178	<0,001
Aminoácidos	3,15	3,23	3,40	3,32	3,276	0,054	0,609

Fonte: González (2021)

\*EPM = erro padrão da média

\*\* - Significância com valor p <0,05

<sup>a,b,c</sup> – média seguidas por letras em comum, não diferem pelo teste Tukey.

F/F: Valor acima da faixa de leitura

As maiores pressões foram encontradas no substrato pectina, a pressão de pectina 0,4 g foi maior a capacidade de medição do manômetro, a dose de 0,2 g de pectina foi a que maior pressão apresentou. As concentrações usadas nos substratos celulose e aminoácidos não tiveram diferenças estatísticas.

##### 3.4.1.2. Efeito da diluição fecal na pressão (PSI).

Na tabela 5 apresenta a resposta na pressão de gás (PSI), em dois diferentes diluições fecais que formam o inóculo.

Tabela 5. Pressão de gás (PSI) em dois diluições fecais usadas como inóculo aferidas em 24 horas com diferentes substratos (0,2 g).

Substrato	1:5	1:10	Média	EPM*	Valor p**
Controle	3,0	3,3	3,2	0,151	0,249
Celulose	3,5	3,3	3,4	0,124	0,584
Pectina	13,7	12,9	13,3	0,394	0,207
Aminoácidos	3,6	3,4	3,5	0,105	0,633

Fonte: González (2021)

\*EPM = erro padrão da média

\*\* - Significância com valor p <0,05

As diluições fecais não influenciaram a pressão de gás nos substratos testados.

### 3.4.1.3. Efeito do tempo de incubação na pressão (PSI).

Na tabela 6 apresenta a resposta na pressão de gás em quatro tempos de incubação de diferentes substratos.

Tabela 6. Pressão de gás (PSI) em diferentes tempos (horas) usando distintos substratos (0,2 g).

Substrato	6	12	18	24	Média	EPM*	Valor p
Controle	3,066	3,300	3,200	3,000	3,142	0,067	0,653
Celulose	3,033	2,933	3,200	3,233	3,100	0,071	0,716
Pectina	8,267 <sup>c</sup>	10,332 <sup>b</sup>	11,234 <sup>ab</sup>	12,673 <sup>a</sup>	10,627	0,921	<0,001
Aminoácidos	3,467	3,533	3,267	3,600	3,467	0,072	0,819

Fonte: González (2021)

\*EPM = erro padrão da média

\*\* - Significância com valor p <0,05

<sup>a,b,c</sup> – média seguidas por letras em comum, não diferem pelo teste Tukey

Os tempos de incubação diferiram significativamente na pressão de gás para o substrato pectina, sendo o maior valor observado nos tempos de 18 e 24 horas. Para os outros substratos, não teve diferença significativa na pressão de gás nos tempos analisados.

### 3.4.2 Experimento 1

Os resultados dos parâmetros fermentativos em função da inclusão do aditivo no processo de fermentação *in vitro*, dependendo do substrato são mostrados na tabela 7.

Tabela 7. Produtos de fermentação do composto aditivo em diferentes níveis com distintos substratos após 24 horas de incubação.

Substrato	Nível do aditivo (mg)									
	0	16	32	48	64					
Volume gás (mL) por frasco										
Celulose	7,901	B	8,641	B	8,826	B	7,901	B	6,790	B
Pectina	44,912	A a	44,912	A a	42,691	A a	44,912	A a	43,431	A a
Aminoácido	8,641	B ab	9,381	B a	8,641	B ab	6,790	B b	7,531	B ab
Sulfeto de hidrogênio (mmol/g MO)										
Celulose	0,041	C a	0,043	C a	0,042	B b	0,034	B b	0,028	B b
Pectina	0,317	A a	0,307	A a	0,265	A b	0,265	A b	0,255	A b
Aminoácido	0,057	B a	0,054	B a	0,049	B ab	0,033	B c	0,039	B bc
Amônia (mmol/g MO)										
Celulose	8,701	B a	8,319	B ab	7,614	B bc	7,283	B c	7,045	B c
Pectina	5,357	C	5,269	C	5,177	C	5,205	C	4,913	C
Aminoácido	16,638	A a	16,241	A a	15,964	A a	14,399	A b	14,144	A b
pH										
Celulose	6,55	A a	6,50	A ab	6,45	A b	6,45	A b	6,45	A b
Pectina	5,95	C b	6,05	C a	6,00	B ab	6,05	B a	6,00	B ab
Aminoácido	6,35	B b	6,40	B ab	6,45	A a	6,40	A ab	6,45	A a

Fonte: González (2021)

Letras maiúsculas deferentes indicam diferença na coluna

Letras minúsculas deferentes indicam diferença na linha



Para o volume gás o substrato pectina teve maior produção em todos os níveis testados que os outros substratos, o substrato aminoácidos teve menor produção de gás nas doses de 48 e 64 mg., e maior produção com 16 mg do aditivo.

A produção de sulfeto de hidrogênio foi maior no substrato pectina em todos seus níveis quando comparado com os outros substratos. Para níveis de inclusão do aditivo, os substratos pectina e celulose, tiveram menor produção nas doses de 32, 48 e 64 mg e para o substrato aminoácidos a menor produção do sulfeto foi nas doses de 48 e 64 mg.

No parâmetro amônia a menor produção foi encontrada no substrato pectina e o substrato aminoácidos apresentou a maior produção. No substrato aminoácidos foram achadas menores produções de amônia nos níveis de 48 e 64 mg de inclusão do aditivo. O substrato celulose teve menores valores com nas doses do aditivo de 32, 48 e 64 mg.

Para o pH , a pectina apresentou menores valores que os outros substratos em todos os níveis de inclusão do aditivo. Em relação aos níveis, para a celulose os menores pH foram nas doses de 32, 48 e 64 mg; na pectina foram encontrados maiores pH nas doses de 16 e 48 mg que o tratamento sem inclusão e para aminoácidos o grupo sem inclusão diferiu dos tratamentos 32 e 64 mg apresentando maiores valores de pH nestes últimos.

#### 3.4.3. Experimento 2.

Os resultados dos parâmetros fermentativos usando como aditivo diferentes ingredientes com propriedades fermentativas e como substrato o resíduo da ração após de DIV, são mostrados nas tabelas 8 (primeira etapa) e 9 (segunda etapa).

Tabela 8. Média dos parâmetros fermentativos em várias doses de aditivo usando como substrato uma ração padrão depois de DIV (primeira etapa).

Aditivo	Dose aditivo (mg)			Volume gás (mL/g MO)	Amônia (mmol/g MO)	AGCC (mmol/g MO)	pH	Dose aditivo (mg)												
	5	10	20					40	5	10	20	40								
								Sulfeto de hidrogênio (mmol/g MO)												
Biobalance	-14,381	-15,412	B	-20,676	AB	-12,938	AB	-0,033	C	b	-0,016	B	a	-0,035	C	bc	-0,039	B	c	
Celulose	-8,492	a	-13,244	B	a	-41,631	C	b	-0,026	B	a	-0,035	D	b	-0,033	C	b	-0,034	B	b
Extrato yucca	-14,355	a	-22,553	B	ab	-32,211	BC	b	-0,038	D	b	-0,024	C	a	-0,028	B	a	-0,037	B	b
Pectina	-3,278	ab	11,141	A	a	-6,608	A	b	-0,007	A	b	0,000	A	a	-0,020	A	c	-0,021	A	c
								Lactato (mmol/g MO)												
Biobalance	0,297	B	-0,095	C	0,429	A	0,161	A	0,000	AB	ab	0,001	AB	a	0,000	A	ab	-0,002	A	b
Celulose	0,494	A	0,497	A	0,509	A	-0,090	B	0,001	AB	a	-0,001	B	b	-0,004	B	b	-0,006	B	c
Extrato yucca	0,228	B	0,207	B	0,072	B	0,051	AB	0,002	A	a	0,000	AB	a	0,001	A	a	-0,003	A	b
Pectina	0,406	AB	0,437	A	0,123	B	0,066	AB	-0,001	B	a	0,001	A	a	0,000	A	a	-0,003	A	b
								AGCR (mmol/g MO)												
Biobalance	3,645	A	a	-4,273	AB	b	-9,668	B	c	-5,751	bc	-0,062	A	a	-0,477	a	-1,209	b	-1,652	b
Celulose	-0,248	A	a	-6,958	B	b	-5,378	A	b	-4,982	b	-0,095	A	a	-0,851	b	-1,046	b	-1,684	c
Extrato yucca	-7,940	B	b	-2,386	A	a	-4,404	A	ab	-4,829	ab	-0,744	B	a	-0,360	a	-0,906	a	-1,729	b
Pectina	3,634	A	a	-2,216	A	b	-6,413	AB	c	-4,934	bc	-0,262	AB	a	-0,506	a	-1,179	b	-1,678	b
								AGCC (mmol/g MO)												
Biobalance	0,028	a	0,055	B	a	0,198	A	a	-0,012	a										
Celulose	0,045		0,018	B	0,052	B	0,058													
Extrato yucca	0,008		0,098	B	0,088	AB	0,032													
Pectina	-0,008	b	0,245	A	a	-0,032	B	b	-0,002	b										

Fonte: González (2022)

DIV: Digestibilidade in vitro (Meineri et al., 2021)

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre aditivos

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre doses do aditivo

Interação significativas (valor - p &lt; 0,03)

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato)

AGCR: Ácidos graxos de cadeia ramificada (valerato, isobutirato, isovalerato, 4 metilvalerato)

O volume de gás diferiu entre aditivos apresentando maiores produções na pectina tendo o valor máximo na dose de 10 mg. Para a pectina e celulose as maiores produções foram nas doses de 5 e 10 mg. o extrato de yucca teve a menor resposta na dose de 20 mg. O biobalance não diferiu no volume de gás nas doses testadas.

O H<sub>2</sub>S diminuiu em todos os substratos e níveis testados exceto para a pectina na dose de 10 mg e este aditivo diferiu dos outros tendo as maiores produções em todos os níveis. O biobalance e a pectina tiveram altas respostas no nível 10 mg, o extrato de yucca os níveis 10 e 20 mg, obtiveram suas maiores produções e a celulose na dose de 5 mg., teve sua maior produção.

O parâmetro amônia não diferiu por nível de inclusão dentro de cada aditivo, mas foi diferente entre aditivos. O valor menor foi no biobalance na dose de 10 mg, e os maiores valores foram na celulose (5 – 10 – 20 mg) e o biobalance no nível de 20 mg.

O lactato diferiu entre aditivos amostrando maiores valores na dose de 5 mg., sendo no extrato de yucca o valor máximo e as menores produções foram achadas na dose de 40 mg. No nível de inclusão, para extrato de yucca e pectina, os valores mais altos foram para as doses de 5, 10 e 20 mg, e na celulose a produção menor foi na dose de 40 mg.

Para os AGCC a pectina apresentou as maiores produções em todos os níveis. No nível 40 não apresentou diferenças entre aditivos, na dose de 5 mg., o extrato de yucca teve a menor produção. Na dose de 10 mg., a celulose apresentou o valor mais baixo e na dose de 20 mg, o biobalance foi o de menor produção. Para níveis de inclusão o biobalance, celulose e pectina mostraram o maior valor na dose de 5 mg. O extrato de yucca teve o menor valor na dose de 5 mg.

Dentro dos AGCR, só diferiram os aditivos na dose de 5 mg, sendo o extrato de yucca o aditivo de menor produção. Para os níveis de inclusão, nas doses de 5 e 10 mg, foram obtidas as maiores produções do parâmetro dentro de cada aditivo.

O pH apenas diferiu entre aditivos nas doses de 10 e 20 mg. Na dose de 10 mg, a pectina teve os maiores valores e na dose de 20 mg, o biobalance atingiu o valor maior. Dentro nos níveis de inclusão, apenas a pectina diferiu entre dose com o valor maior na dose de 10 mg.

Tabela 9. Média dos parâmetros fermentativos em várias doses de aditivo usando como substrato uma ração padrão depois de DIV (segunda etapa)

Aditivo	Dose aditivo (mg)			
	5	10	20	40
	Sulfeto de hidrogênio (mmol/g MO)			
Carvacrol	-0,028 B ab	-0,030 B b	-0,027 A a	-0,031 B b
FOS	-0,027 B b	-0,031 B c	-0,029 AB bc	-0,022 A a
MOS	-0,036 C b	-0,030 B a	-0,031 B a	-0,032 B a
GOS	-0,019 A a	-0,026 A b	-0,030 AB c	-0,035 C d
	Lactato (mmol/g MO)			
Carvacrol	0,002 B b	0,006 A a	-0,001 B c	-0,009 A d
FOS	0,006 A a	0,001 B b	0,000 AB b	-0,002 B b
MOS	0,002 B a	0,001 B a	-0,003 B b	-0,005 B b
GOS	0,000 B ab	0,001 B ab	0,002 A a	-0,002 A b
	AGCR (mmol/g MO)			
Carvacrol	0,215 A a	-0,226 AB ab	-0,264 A b	-1,148 B c
FOS	0,210 A a	-0,510 B b	-0,943 B b	-0,771 AB b
MOS	-0,191 A a	-0,286 AB a	-1,050 B b	-1,141 B b
GOS	0,190 A a	0,038 A ab	-0,312 A b	-0,355 A b
	pH*			
	Média			
Carvacrol	0,022	0,045	0,065	0,075
FOS	0,025	-0,022	-0,005	-0,078
MOS	-0,075	-0,045	-0,062	-0,095
GOS	-0,035	-0,005	-0,068	-0,095
Média	-0,016	-0,007	-0,018	-0,048

Fonte: González (2022)

DIV: Digestibilidade in vitro (Meineri et al., 2021)

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre aditivos

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre doses do aditivo

Interação significativas (valor – p < 0,006)

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato)

AGCR: Ácidos graxos de cadeia ramificada (valerato, isobutirato, isovalerato, 4 metilvalerato)

\* Interação não significativa (valor-p= 0,8538), foi analisado efeitos simples

O volume de gás foi diferente entre aditivos sendo o carvacrol o que apresentou a menor produção em todos os níveis. Para a dose de inclusão apenas o MOS e o GOS tiveram diferenças, o GOS teve seu valor inferior na dose de 20 mg, e para o MOS na dose de 10 mg foi valor menor.

O H<sub>2</sub>S diferiu entre aditivos, na dose de 5 e 10 mg, o GOS mostrou as maiores produções. Para o carvacrol os valores mais baixos foram nas doses de 10 e 40 mg. O MOS teve a menor produção na dose de 5 mg de inclusão. A diminuição na produção no GOS, está diretamente relacionada a dose de inclusão.

Para amônia os aditivos diferiram entre eles, o GOS apresentou respostas maiores nas doses de 20 e 40 mg., o MOS mostrou o valor menor na dose de 10 mg. e para o FOS seu resultado foi menor na dose de 5 mg. Para as doses de aditivo, o carvacrol e o MOS tiveram uma relação inversa entre a produção do parâmetro com o nível de inclusão, o GOS mostrou diminuição do parâmetro na dose de 40 mg.

O lactato diferiu entre aditivos com a maior produção do FOS na dose de 5 mg., e carvacrol na dose de 10 mg., o GOS teve resultados maiores na dose de 20 mg. Nos níveis de inclusão, todos os aditivos tiveram a menor resposta na dose de 40 mg.

Para os AGCC os aditivos diferiram entre eles, na dose de 5 mg., o MOS teve a menor produção. Na dose de 10 e 20 mg., o GOS apresentou o valor mais alto entre aditivos. Na dose de 40 mg., o carvacrol foi o de menor produção. Nas doses de inclusão, o FOS, MOS e GOS tiveram as maiores produções de AGCC na dose de 40 mg. O carvacrol foi diminuindo a resposta em doses crescentes de inclusão.

Dentro dos AGCR, os aditivos não diferiram apenas na dose de 5 mg. O GOS foi superior na produção do parâmetro nas doses de 10, 20 e 40 mg. Para todos os aditivos foi demonstrada diminuição nos AGCR com aumento nas doses de inclusão.

O pH apenas teve interação entre aditivos e não entre dose de inclusão, apresentando o valor máximo do parâmetro no aditivo carvacrol, tendo semelhança entre os outros aditivos.

### 3.5 DISCUSSÃO.

A capacidade fermentativa bacteriana intestinal no gato ocorre em maior extensão no intestino grosso e a aplicabilidade de metodologias *in vitro*, que permitam entender os processos fermentativos e a dinâmica de geração de produtos em resposta a compostos com potencialidade alimentar, proporciona ferramentas úteis na hora de serem implementados como ingredientes na nutrição animal. A FIV estática por lotes aplicada neste trabalho é um modelo usado frequentemente (LOWMAN; THEODOROU; HYSLOP, 1999; WILLIAMS et al., 2005a; MARTÍN-PELÁEZ et al., 2008; GOMEZ et al., 2010; INNESS et al., 2011; CATTANI et al., 2014), este sistema tem como vantagens que é simple, fácil de executar, com alta reprodutibilidade e o método de escolha para estudar rotineiramente produtos de fermentação no intestino grosso para fins de avaliação de alimentos (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005; VERHOECKX; COTTER; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2015). Por outro lado, apresentam limitações na simulação das características fermentativas do TGI com mudanças do ambiente bioquímico, alterações no desaparecimento do substrato e o acúmulo de produtos do metabolismo microbiano que restringe a possibilidade de ter microorganismos balanceados que interferem na fermentação (VERHOECKX; COTTER; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2015; JI et al., 2022). A metodologia usada para FIV neste estudo permitiu nos adequar as necessidades e condições dos experimentos e parâmetros fermentativos a analisar, na literatura existem variadas abordagens para FIV não existindo “padrão” nem de método nem de produtos a serem avaliados; no caso do médio de cultura, os estudos são altamente variáveis, que usam desde apenas buffer fosfato (EDWARDS et al., 1996), até métodos sofisticados de FIV dinâmica, que tem com fatores controlados como pH, reposição contínua de nutrientes, controle da temperatura e das condições anaeróbicas, (VERHOECKX; COTTER; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2015). Neste estudo o médio de cultura ((WILLIAMS et al., 2005a), foi modificado com a finalidade de empregar uma análise para dosar o  $H_2S$  na fase gasosa, a modificação não empregou o sulfeto de sódio nanohidratado ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) na solução reagente redutor, baseado no fundamento que as bactérias redutoras de sulfato sintetizam  $H_2S$  a partir de  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (HUGHES; CENTELLES; MOORE, 2009), que aumenta a produção de  $H_2S$  usando como substrato o médio de fermentação e não dos ingredientes a serem analisados. O  $H_2S$  é considerado um gás tóxico para o organismo, sintetizado por bactérias redutoras

de sulfato e acredita-se que inibe a oxidação do butirato, fonte importante de energia para os colonocitos, e *in vitro* o H<sub>2</sub>S, também demonstrou a geração de lesões nos colonocitos cultivados, que são compatíveis com aquelas encontradas na colite e que foram sugeridas como envolvidas na patogênese da doença inflamatória intestinal felina (INNESS et al., 2007).

Um parâmetro importante usado como indicador de fermentação é a pressão de gás (THEODOROU et al., 1994), sendo escolhido como parâmetro neste estudo para a padronização da metodologia, as técnicas de produção de gás fornecem uma medida da proporção do substrato que é fermentado e não é usado para o crescimento microbiano, representando a potencialidade de ser aproveitado pelo organismo do animal (RYMER et al., 2005). Os resultados da maior produção de gás no substrato pectina em diferentes níveis (pré-experimento) era esperado, a pectina é uma fibra altamente solúvel e fermentável que tem sido bem estudada de forma rotineira *in vitro* por muitos estudos (HUSSEIN; FAHEY, 1995; BOSCH et al., 2008; BARRY et al., 2010, 2011; BIAGI et al., 2010; ROCHUS et al., 2013), a pectina é dissociada a AGCC em decorrência da fase de fermentação no intestino grosso (SILVA JUNIOR, CABRAL FILHO S, SILVA F, SILVA K, CABRAL A; COSTA F, NAVARRO R, 2018), eventos que não acontecem com essa magnitude com os outros substratos testados. As concentrações de inóculo fecal para FIV variam na literatura, sendo os principais diluições 1:5 (MABJEESH; COHEN; ARIELI, 2000; WILLIAMS et al., 2005a; MONTOYA; DE HAAS; MOUGHAN, 2018) e 1:10 (GUEVARA et al., 2008; ALAM et al., 2012; BOSCH et al., 2017a; CALABRÒ; CUTRIGNELLI, 2018), mas encontrando razões diferentes em outros estudos (BOSCH et al., 2013; PINNA et al., 2017); neste estudo não foi achada diferença significativa na diluição do inóculo na resposta de pressão de gás, concordando com um estudo antigo (WEAVER et al., 1989), no qual, fermentações repetidas de glicose e amido usando suspensões fecais humanas de (1:5 e 1:10) amostradas durante um período de 3,5 anos, foram relativamente constantes nos parâmetros fermentativos; neste estudo foi usada a diluição 1:10, convindo com WILLIAMS et al., (2005), que expressa, que a diluição depende da quantidade de material disponível, número de frascos de fermentação ou de sua fluidez (ou seja, suficientemente líquido para permitir a injeção de inóculo). No pré-experimento, o efeito do tempo na produção de gás não diferiu entre os

substratos celulose e aminoácidos, demonstrando a baixa sua capacidade de produção de gás, indicando que suas propriedades fermentativas não estão relacionadas com a produção de gás; caso contrário, a pectina aumentou sua produção ao longo dos períodos testados, tendo a maior produção no tempo de 24 horas e com diferenças significativas em todos os tempos quando comparados com os outros substratos ( $p < 0,001$ ). Segundo o estudo de Coles et al., (2005), a maioria de metodologias estáticas empregam tempos de incubação de 24 horas o que é conveniente no laboratório, embora esse tempo seja um período parecido ao tempo total de trânsito através de todo o TGI (20 a 32 horas) no gato adulto (PEACHEY; DAWSON; HARPER, 2000); mas um estudo (MORTENSEN et al., 1991) concluiu, que incubações maiores que 24 horas em modelos estáticos, a fermentação pode ser afetada pela inibição do produto final que resulta no declínio da população microbiana e na morte de bactérias.

Sabe-se que a fermentação pode ser conduzida em uma direção “positiva” pelo uso de componentes dietéticos, como carboidratos fermentáveis, aditivos, ou ervas, tendo como princípio, que um ingrediente apropriado na dieta estimulará uma ou mais espécies bacterianas supostamente apropriadas que vão favorecer o ambiente intestinal (WILLIAMS et al., 2005a). Os aditivos na fermentação *in vitro*, são compostos que quando adicionados, limitam a utilização do substrato pelos microorganismos, com a finalidade de impedir ou diminuir a geração de alguns produtos fermentativos, focado principalmente em aqueles compostos considerados como indesejáveis. Neste estudo no experimento 1, o volume de gás foi influenciado pelo substrato, obtendo como esperado, maiores produções na pectina em todos os níveis de inclusão do aditivo pela capacidade de fermentação de compostos voláteis (BARRY et al., 2011; ROCHUS et al., 2013). O substrato aminoácidos apresentou maior produção numérica no nível 16 deferindo da dose de 48 mg e sendo maior à dose de 64 mg., no qual, em níveis maiores do aditivo, que fornecem mais quantidade de carboidratos potencialmente fermentáveis (mais de 2,6 vezes) como MOS e betaglucano, não aumentou o volume final de gás, podendo ser atribuída esta diminuição com outro componente do aditivo, o óleo essencial de orégano que como foi relatado num estudo *in vitro* (RIVAS et al., 2010) em líquido ruminal usando carvacrol (um dos componentes do óleo essencial do orégano), houve diminuição no volume de gás em doses crescentes devido principalmente



a sua capacidade de inibir o crescimento de várias espécies bacterianas, e segundo o relatado em outro estudo (ONEL et al., 2022) em líquido ruminal, foi encontrada também diminuição na produção de gás entre controle e o tratamento com carvacrol às 24 horas de incubação (39,30 mL e 33,60 mL; respectivamente). Dos outros componentes orgânicos do aditivo, o extrato de *yucca schidigera* não teria influência na diminuição da pressão de gás, segundo o relatado por SINGER et al., (2008), no qual, empregando doses crescentes de *yucca schidigera*, em diferentes rações para ruminantes, houve um aumento linear na taxa de produção de gás ( $p=0,04$ ) e em outro estudo em ruminantes (XU et al., 2010), a produção de gás em dietas com 90% de ração, não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos com a inclusão de *yucca schidigera* ( $p>0,05$ ).

A produção de  $H_2S$  foi influenciada pelo substrato, a pectina teve os valores maiores em todos os níveis, resultados que eram esperados pelo maior volume de gás, tendo até seis vezes maiores valores em média quando comparado com os outros substratos, a pectina apresentou diminuição nos níveis de 16, 48 e 64 mg., que exibe comportamento similar com os outros substratos; para os aminoácidos, à presença de taurina (3,6%), fornece 1,85 mg de enxofre para cada frasco de fermentação aumentando a quantidade de substância para reduzir  $H_2S$ , o que pode refletir o comportamento de maior produção com respeito a celulose nas doses de 0 e 16 mg. Apesar da escassa literatura sobre a dosagem de  $H_2S$  na fase gasosa em FIV, um estudo em suínos (ALAM et al., 2012), reporta diminuição na concentração de  $H_2S$  na fase gasosa com a adição de *Orégano lippia* (planta usada para a obtenção de óleo essencial de orégano) em 12 horas de incubação (controle 280,33 mg/L e 25,67 mg/L; *Orégano lippia*) e não achando  $H_2S$  após de 24 horas de incubação com a inclusão de orégano, arguindo que este efeito benéfico é devido, que o orégano ativa bactérias que usam enxofre em outras rotas metabólicas como para sulfato ( $SO_4$ ), concluindo que o emprego de orégano favorece a redução do S convertendo-o em sulfato. Apesar de não serem avaliados neste experimento os efeitos do orégano como planta, essas opiniões parecem corroborar os resultados observados na inclusão do aditivo independente do substrato. O uso da yucca como composto inibidor da produção  $H_2S$  tem sido pouco estudada, numa pesquisa (GIFFARD et al., 2006), usando como inóculo fezes de cães e

sem emprego de substrato, relatou que a concentração de  $H_2S$  foi significativamente ( $P < 0,001$ ) reduzida pelo uso de *Yucca schidigera* quando comparada com a concentração nos frascos de controle. Embora, a yucca tenha capacidade para restringir a formação de  $H_2S$ , as maiores pesquisas estão relacionadas com suas qualidades de inibir a produção de amônia (LOWE et al., 1997; ROQUE et al., 2011; PINNA et al., 2017). Para o controle da formação de amônia, está descrito que as saponinas presentes na yucca, são os compostos relacionados com a redução na formação de amônia intestinal (AMON et al., 1995; GIFFARD et al., 2006; WINDISCH et al., 2008; ROQUE et al., 2011; ALAM et al., 2012), pela diminuição da atividade da urease intestinal e enzimas fecais envolvidas no ciclo metabólico da ureia; WINDISCH et al., (2008) relatam que partes das substâncias ativas da yucca são altamente odoríferas ou podem ter sabor que pode restringir seu uso para fins de alimentação animal. Neste estudo, o substrato aminoácidos apresentou a maior produção de amônia como esperado pela grande quantidade de nitrogênio fornecido no ambiente *in vitro* e como relatado num estudo (DAVILA et al., 2013), a concentração de íons amônio no intestino resulta principalmente da desaminação dos aminoácidos e da hidrólise da uréia pelas bactérias intestinais. A pectina apresentou os níveis mais baixos entre substratos, independentemente do nível de aditivo, resultados que eram esperáveis, fato relacionado pelo substrato que limita a produção de nitrogênio amoniacal; num estudo (SMITH; MACFARLANE, 1998), foi observado, que quando adicionados carboidratos fermentáveis, houve diminuição da fermentação de peptídeos e aminoácidos em favor da fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal; em outro estudo (BIANCHI et al., 2018), a redução de  $NH_4^+$  parece estar mais relacionada à diminuição de bactérias proteolíticas, que utilizam aminoácidos como fontes de nitrogênio, carbono e energia, gerando  $NH_4^+$  como um dos metabólitos intermediários ou finais e nesse estudo, foi evidenciada coincidentemente uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de *Clostridium* spp. em todos os tratamentos usando pectina assim como *Streptococcus* e *Bacteroides* nos tratamentos probiótico mais pectina e só pectina, reduzindo assim, os níveis de íons amônio. No substrato celulose não era esperada a resposta da amônia, apresentando redução dos níveis de amônia a teores altos do aditivo, tendo menores níveis de amônia nas doses de 32, 48 e 64 mg.; a celulose é uma fibra pouco solúvel e

pouco fermentável sendo geralmente usada em FIV como controle negativo nos testes (DANIEL et al., 1997; BARRY et al., 2011; CALABRÒ et al., 2013; ROCHUS; JANSSENS; HESTA, 2014), os níveis de amônia e principalmente seu valor no grupo controle (8,701 mmol/ g MO), pode estar relacionado possivelmente, pela inclusão das fontes de nitrogênio iniciais no preparo do médio de fermentação que fornecem 3,76 mg. de nitrogênio por frasco de fermentação, não sendo afetado este valor, pela inclusão da celulose como aconteceu nos outros substratos. Neste estudo, a tendência na produção de amônia diminuiu conforme os níveis de inclusão do aditivo foram aumentando, tendo menores respostas nas inclusões de 48 e 64 mg., indicando uma relação dose-resposta. O uso de levedura de *S. cerevisiae* para modulação de produtos de fermentação *in vitro* é controverso, num estudo *in vitro* dinâmico de vários compartimentos (VAN DEN ABEELE et al., 2020a), a produção de amônio permaneceu inalterada nas dose de 0,5 e 1g/d., mostrando aumento significativo com a dose de 2,0 g/d no compartimento do cólon distal, provavelmente devido à adição de proteínas (25%) que estavam contidas no produto teste à base de *S. cerevisiae* e considerando que a fermentação no cólon distal é principalmente proteolítica e a fermentação de carboidratos ocorre principalmente no cólon proximal (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001). Segundo o concluído num estudo (ROBERFROID et al., 2010), em geral, pesquisas em animais de laboratório mostraram que oligossacarídeos diminuem as atividades das enzimas colônicas, no entanto, estudos em humanos produziram resultados inconsistentes ou negativos em tais atividades enzimáticas ou na produção de metabólitos bacterianos tóxicos, como amônia. Mais recente (VAN DEN ABEELE et al., 2020b), usando inoculos fecais de cão e gato em diferentes extratos de levedura, apresentaram aumentos e diminuições nos níveis de amônia após de 48 horas de incubação com efeitos mais pronunciados nos níveis de amônia para o inóculo felino. O pH apresentou os valores menores para o substrato pectina em todos os níveis de inclusão do aditivo, resultados esperáveis pela presença de compostos ácidos produzidos durante a fermentação deste carboidrato, a explicativa do descenso é pela presença de AGCC, que faz com que o pH caia rapidamente (RABA; ADAMBERG; ADAMBERG, 2021). Nos níveis de inclusão, apesar os resultados diferir nas doses de inclusão, as respostas foram mantidas dentro da faixa recomendada

do pH colônico [6 – 7 (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005)], comprovando a potência buffer da solução carbonato do médio de fermentação. Na pectina sem adição do aditivo, apresentou o valor menor (5,95) podendo ser relacionada esta queda com o aditivo que produz aumento do parâmetro.

O substrato usado para fermentação no experimento 2, foi o resíduo de uma ração extrusada padrão para gatos após de digestão *in vitro* com o fim de simular os processos que ocorrem no intestino delgado; estudos tem empregado de forma rotineira esta etapa (NOACK et al., 2013; CORREA-BETANZO et al., 2014; PÉREZ-BURILLO et al., 2019; ONEL et al., 2022), principalmente sendo realizado em sistemas dinâmicos de vários compartimentos (PAYNE et al., 2012; BIANCHI et al., 2018; JI et al., 2022). O experimento 2, teve como objetivo determinar diferenças nas propriedades de fermentação entre aditivos usados na alimentação de gatos que por suas características e composição, tem diferentes respostas fermentativas inerentes a sua natureza. Na primeira fase, como esperado, a pectina e o biobalance nas doses maiores de inclusão, as produções de gás foram; a pectina é considerada um composto altamente solúvel e fermentável com alta capacidade de produzir AGCC (BOSCH et al., 2008, 2017a; BIANCHI et al., 2018) e o biobalance tem dentro de sua fórmula MOS (2,5%) e carboidratos potencialmente fermentáveis (56,91%), apesar da celulose e extrato de yucca serem compostos ricos em carboidratos (93 e 79,11%; respectivamente), possuem baixas propriedades fermentativas ((DOS REIS et al., 2016; MONTOYA; DE HAAS; MOUGHAN, 2018). Na segunda fase, o FOS, MOS e GOS tiveram maiores produções nas doses altas de inclusão resultados esperáveis pela capacidade fermentativa dos oligossacarídeos, tendo no GOS a maior resposta no volume de gás da etapa e apresentou comportamento similar à pectina, segundo SMIRICKY-TJARDES et al., (2003), a maior taxa de fermentação do GOS está relacionada na sua alta capacidade fermentativa, que pode servir como substrato fermentável no intestino delgado terminal e no intestino grosso proximal e também concordando, foram encontradas baixas produções do MOS dentre oligossacarídeos testados, concluindo, que sendo extraído da levedura, contém quantidades maiores nitrogênio, fibra dietética total e gordura e portanto, tem ingredientes que não fermentam tão rapidamente e podem potencialmente interferir na negativamente na fermentação. Respostas que não eram esperadas foram a diminuição da

produção de gás nas doses maiores de inclusão da pectina, a hipótese deste comportamento pode estar relacionada pela razão aditivo:inóculo empregada neste experimento, explicando uma ação mais rápida dos microorganismos sobre o aditivo em baixos níveis de inclusão, com uma razão 1:1000 na dose de 5 mg., 1:125 e 1:250 nas doses 40 e 20 mg, respectivamente, gerando fermentações mais rápidas pela maior densidade de microorganismos por unidade do aditivo, também é considerado um possível efeito tóxico para os microorganismos nas doses maiores do aditivo, num estudo (RYMER et al., 2005), se o carboidrato estiver em excesso, os microorganismos irão "inundar" de energia o meio de fermentação em forma de ATP e um excesso de ATP parece ser tóxico para os microorganismos e, portanto, a microbiota deve adotar estratégias metabólicas que produzam menos ATP, o que resulta na adoção de diferentes vias de fermentação que limitem uma geração excessiva de energia. Reforçando os possíveis efeitos tóxicos (WILLIAMS et al., 2005b), é relatado que em metodologias de sistemas fechados, a quantidade de compostos fermentativos adicionados deve ser limitada para evitar que os mecanismos de feedback negativo entrem em ação limitando os processos fermentativos.

Dentro dos resultados da produção de  $H_2S$ , o comportamento do aditivo pectina concorda com os resultados do Experimento 1 deste estudo, no qual, as produções mais altas do parâmetro estão relacionadas à maior produção de gás do aditivo e que em doses maiores de inclusão, existe uma diminuição dos níveis de  $H_2S$ , explicando este comportamento pelo aditivo que aumenta a produção de AGCC modificando o pH do meio, limitando o crescimento de microorganismos redutores de  $H_2S$ , concordando com um estudo (RABA; ADAMBERG; ADAMBERG, 2021), que em duas doses de pectina de maçã (0,05 L/h e 0,2 L/h) em FIV contínua, acharam menor produção de  $H_2S$  ( $p < 0,05$ ) na dose alta, esse aditivo limita a conversão do agente redutor cisteína em  $H_2S$  pela microbiota fecal, além disso relata que, em pH altos próximo a 8, aumenta a solubilidade do  $H_2S$  que leva à formação de íons  $HS^-$ , que poderiam inibir as bactérias produtoras de butirato. Comportamento similar à pectina foi achado no aditivo comercial e no GOS nas doses de inclusão, nos quais, apresentaram menores produções nos níveis de inclusão mais altos, num estudo (YUNILAS et al., 2013), reporta que em compostos contendo fibras fermentáveis, as bactérias diminuem a produção de gás  $H_2$  e  $CO_2$  e limitam a formação de  $H_2S$ .

Comportamentos não esperados foram achados no FOS e MOS neste estudo, amostrando tendências de maior produção nas doses de inclusão mais altas, a literatura é escassa em estudos *in vitro* nestes oligossacarídeos, a maioria da evidência indica que os compostos carboidratos fermentáveis, pela sua ação no pH, diminui a formação de H<sub>2</sub>S. Num estudo fecal em gatos (HESTA et al., 2005), não foram encontradas diferenças em compostos sulfurados entre o grupo controle e o grupo tratamento com FOS. Num estudo em humanos (LEWIS et al., 2005), foi encontrada uma concentração reduzida fecal de sulfeto de hidrogênio após a suplementação de FOS e é possível que o mecanismo de ação seja via fermentação redutora de aminoácidos sulfurados, também foi constatado num estudo em ruminantes (MORINE et al., 2014), que o aumento da fermentação de carboidratos, gerou uma diminuição no pH colônico, diminuindo a produção de H<sub>2</sub>S. Os testes realizados neste experimento não foram suficientes para determinar uma possível interação da microbiota com o substrato e aditivos nas doses testadas, podendo alterar a microbiota nos diferentes tratamentos e que consiga explicar a possível causa da variação nos resultados do H<sub>2</sub>S.

Os níveis mais baixos da produção de amônia entre aditivos na primeira etapa, foram encontrados no extrato de yucca e pectina e não foram afetados pelo níveis de inclusão, concordando com o experimento 1, no qual, no extrato de yucca tem influência na diminuição na produção de amônia pela fração saponina, e para a pectina, o comportamento é explicado pelo aumento das populações microbianas sacarolíticas e diminuição das proteolíticas. O carvacrol, FOS, GOS e MOS apresentaram baixos níveis de amônia com a inclusão da maior dose dos aditivos. Como relatado no experimento 1, a presença de carboidratos fermentáveis, apresenta uma diminuição da fermentação de compostos nitrogenados pelas bactérias proteolíticas, que utilizam aminoácidos como fontes de nitrogênio, carbono e energia diminuindo a produção de compostos nitrogenados como o nitrogênio amoniacal (BIANCHI et al., 2018).

A despeito do lactato, nas duas etapas, a média nos aditivos tem variações mínimas entre eles (entre 0,006 e -0,009 mmol/g MO), num estudo (MORTENSEN et al., 1991), usando uma metodologia de detecção de lactato de forma enzimática, não foram encontradas mudanças nas concentrações de

lactato, usando como substratos pectina, celulose e glicose em diferentes dose (0 – 30 mg./mL) e reportando para 24 horas de incubação níveis de até zero mmol/L de lactato, concordando com outro estudo (DUNCAN; LOUIS; FLINT, 2004), onde foram encontrados níveis muito baixos de lactato (<5 mmol) usando bactérias específicas como inóculo, Na literatura é comum para determinar lactato em FIV a cromatografia gasosa pelas baixas concentrações de este parâmetro no médio de cultura (CZAUDERNA; KOWALCZYK, 2008; BLAKE et al., 2019) e neste estudo a abordagem metodológica para determinar lactato parece inovadora. Apesar das baixas variações numéricas achadas entre aditivos neste estudo, foram encontradas diferenças estatísticas entre aditivos e doses, sendo relevantes as menores produções do lactato nas doses mais altas de inclusão do aditivo independente de sua composição, pela natureza ácida do lactato, parece necessário manter níveis baixos deste parâmetro para ter a microbiota estável, segundo um estudo (ANGUITA et al., 2006), achou em FIV usando digesta ileal de suínos, que a concentração de ácido láctico aumentou durante as primeiras horas de fermentação e desapareceu com o tempo, refletindo o caráter intermediário deste produto dentro dos processos fermentativos in vitro.

Os AGCC são compostos desejáveis nos processos fermentativos, são conhecidas suas funções benéficas no animal, sendo relevante fornecer compostos que aumentem sua produção (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003). Os aditivos testados neste estudo são inerentemente diferentes nas suas fontes e composições, tendo diferentes características de fermentação e comportamento nas quantidades de AGCC produzidas, que quando comparados com a literatura, podem ser resultado de várias diferenças como fonte de inóculo fecal, substrato usado e a inclusão e níveis testados, conforme foi relatado por FLICKINGER et al., (2000), os perfis e concentrações de AGCC, variam entre aditivos. Diferentes taxas de fermentação de fermentação do substrato resultaram em grandes diferenças nas quantidades de AGCC produzidas (SUNVOLD et al., 1995). Neste estudo, na primeira etapa e como esperado, a pectina diferiu dos outros aditivos, apresentando os níveis mais altos de AGCC nas doses testadas, exceto na dose de 40 mg., de inclusão. Resultados inesperados apareceram nas doses de inclusão da pectina, obtendo as produções mais baixas nas maiores doses, comportamento que pode estar

relacionado com os mecanismos compensatórios da microbiota para manter um pH adequado, segundo um estudo (MORTENSEN et al., 1991), é necessário um metabolismo acelerado da microbiota sobre os AGCC para evitar níveis do pH abaixo de 5,5 mantendo níveis adequados para a microbiota colônica (ALEXANDER et al., 2019). Neste estudo à dose de inclusão de 5 mg., gerou uma maior produção de acetato com uma razão molar de ácido acético, propiônico e butírico de 60:25:15 respectivamente, sendo razões frequentemente achadas em outros estudos (TAZOE et al., 2008; ALEXANDER et al., 2019), na dose de 40 mg., houve uma diminuição no total de AGCC a razão molar foi de 52:30:18, apresentando diminuição do acético e aumento do propiônico e butírico. O acetato é a principal rota e produto da fermentação de carboidratos para a maioria das bactérias anaeróbicas intestinais e quase invariavelmente atinge as maiores concentrações entre os AGCC no lúmen intestinal, usando como rota principal a redução via acetil CoA, em contraste, o propionato e o butirato são produzidos por subconjuntos distintos de bactérias intestinais (LOUIS; FLINT, 2017). A possível explicativa desta diferença na diminuição de AGCC e a mudança na razão molar, que pode estar relacionada com a preferência da microbiota para usar a rota butiril-CoA:acetato CoA transferase empregando o acetato para produzir butirato, o que aumenta ligeiramente o pH, sendo um mecanismo protetivo para pHs muito baixos (LOUIS; FLINT, 2017). A constante de dissociação ácida (pKa) do ácido acético é de 4,757 ligeiramente mais baixo que o butirato com um pKa de 4,819, no qual, o butirato tem um potencial ácido menor do que o acetato (HURST et al., 2014). A forma que o acetato é usado pelo butirato está relacionado com suas maneiras de redução, sendo uma delas a partir de butiril-CoA, que prossegue via butiril-CoA:acetato CoA-transferase usando como substrato o acetato (LOUIS; FLINT, 2017), desta forma, na via butiril-CoA:acetato CoA-transferase existe um aumento do butirato, que usa para sua sínteses uma molécula de acetato e uma de acetil-CoA, diminuindo dessa forma o acetato, o que reflete no total de AGCC pela diminuição do seu principal produto e que emprega além do acetato o acetil CoA (principal substrato do acetato) para formar apenas uma de butirato, existindo dessa forma uma diminuição do total de AGCC. O GOS apresentou em todos os níveis os maiores valores entre aditivos, resultados que concordantes com um estudo (FEHLBAUM et al., 2018), no qual, foi encontrado um aumento



dependente da dose quando comparado com outros oligossacarídeos, num estudo *in vitro* em suínos (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003), foi achada a produção total de AGCC em 12 h semelhante para todos os FOS e transgalactoligossacarídeos, glicoligossacarídeos mas variando em quantidade e razões de AGCC produzidos. Neste estudo nos níveis de inclusão, a máxima produção foi na dose de 40 mg., para o FOS, MOS e GOS, demonstrando a capacidade fermentativa dos oligossacarídeos a diferença do carvacrol, que sendo um óleo essencial não tem capacidade fermentativa, estes valores superiores concordam com as maiores produções de gás, tendo uma relação direta entre eles, sendo considerada a produção de AGCC como componente principal do volume de gás (RYMER et al., 2005; NOACK et al., 2013), estes resultados concordam com um estudo em cães (FLICKINGER et al., 2000), que encontraram para FOS e GOS após de 24 horas de incubação produção semelhante de AGCC; a fermentação do MOS resultou na menor produção de AGCC dentro dos oligossacarídeos, o MOS é um extrato bruto de levedura e contém 6% de N, 41% de fibra dietética total, 8% de gordura e 44% de monossacarídeos totais com base na matéria seca, por tanto, tem ingredientes que não fermentam tão rapidamente como nitrogênio e gordura, que podem potencialmente inibir a fermentação. Além disso, o componente fibroso dos mananoligossacarídeos pode retardar sua fermentabilidade (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003).

Dos AGCR, na primeira etapa, apresentaram diferença em todos os aditivos apenas no nível de inclusão de 5 mg., sendo o extrato de yucca e pectina os de menor produção, para a pectina, relacionada esta tendencia como já foi mencionado pela preferência das bactérias por compostos carboidratos para produzir AGCC e diminuir a proporção de AGCR (BARRY et al., 2011; BELOSHAPKA et al., 2012; CALABRÒ et al., 2013), comportamento semelhante amostraram os oligossacarídeos da segunda etapa, que apresentaram diminuições na produção do parâmetro relacionadas com aumento nas doses, um estudo (BARRY et al., 2011), empregando FOS e pectina como aditivos, encontrou diminuição de AGCR no substrato FOS e pectina, observando que quando as concentrações de AGCC aumentam, os AGCR diminuem com a suplementação, indicando uma mudança na fermentação de proteínas. Numa pesquisa em suínos (MARTÍN-PELÁEZ et al., 2008), foi achada uma menor

concentração de AGCR quando foi usado FOS em comparação com xiloligossacarídeos, em cães (CALABRÒ et al., 2013), analisando vários compostos prebióticos acharam menor produção de AGCR após de 48 horas de fermentação no FOS e parede celular de levedura (fonte de MOS), quando comparados com o controle. Para o extrato de yucca e carvacrol, apesar de diferir nos níveis de inclusão com diminuição nas doses maiores, a literatura não tem muitos estudos em FIV em *pets*, num estudo em ruminantes (XU et al., 2010), acharam tanto diminuição quanto aumento de AGCR com suplementação do extrato de yucca em forragens, num estudo *in vitro* usando fezes de cães e gatos (PINNA et al., 2017), observaram aumento de ácido iso- valérico com inclusão de 100 mg/L de extrato de *yucca schidigera*, em um estudo *in vitro* (VIERBAUM et al., 2019) em cães, analisando *yucca schidigera* não acharam diferenças estatísticas na inclusão de 4g/L do aditivo. A resposta do biobalance ao incremento da dose foi em baixa dos AGCR, explicando este comportamento por seus ingredientes como MOS, extrato de yucca e carvacrol que como mencionado, tem influência na diminuição dos AGCR.

As diferenças no pH entre aditivos, apenas foram evidentes nas doses de 10 e 20 mg., de inclusão na primeira etapa, achado inesperado foi o valor na dose de 10 mg, da pectina, que diferiu tanto entre aditivos quanto no nível de inclusão, nos dados brutos estes valores ficaram muito próximos do pH 7 (média 6,99) que estão dentro da faixa desejada (6 – 7) dentro do médio de fermentação que simula o pH colônico (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005)], sendo o ideal 6,8 em FIV para sistema de lotes (WILLIAMS et al., 2015), os valores deste tratamento surpreendentemente foram significativamente maiores dos outros tratamentos com pectina, no qual, era esperado um comportamento similar, embora, esta elevação de pH não influenciou a produção de gás nem AGCC, que apresentaram neste tratamento suas maiores produções. Na segunda etapa, apenas houve diferenças entre aditivos comprovando o poder do buffer usado no médio de fermentação, amostrando os valores menores nos oligossacarídeos, resultados esperados pela produção de compostos ácidos da fermentação destes carboidratos, levando a uma diminuição do médio (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003; DOS SANTOS FELSSNER et al., 2016), processo que não aconteceu no aditivo carvacrol

Embora muitos métodos *in vitro* sejam derivados de métodos relatados anteriormente, há uma variação significativa no uso de parâmetros de fermentação *in vitro* entre os modelos, impedindo a possibilidade de comparar resultados entre grupos de pesquisa e deduzir resultados gerais (MINEKUS et al., 2014). Houve diferenças entre aditivos e níveis, indicando que a grande variação entre ingredientes e que não devem ser feitas suposições quanto à fermentabilidade dos compostos.

### 3.6 CONCLUSÕES

O blend contendo MOS, extrato de yucca, e carvacrol mostrou diminuição de amônia e sulfeto de hidrogênio, produtos não desejáveis da fermentação. A pectina, MOS, FOS e GOS usados em FIV como aditivos fermentáveis ,tem impacto no processo de fermentação aumentando AGCC e diminuindo os AGCR, embora tenha sido observada uma diminuição na formação de compostos tóxicos, não é possível afirmar se os aditivos testados nessas doses terão efeito na suplementação dietética de gatos adultos.

## Referências

- ALAM, M. J. et al. Bacterial community dynamics during swine in vitro fermentation using starch as a substrate with different feed additives for odor reduction. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 5, p. 690–700, 2012.
- ALEXANDER, C. et al. Perspective: Physiologic Importance of Short-Chain Fatty Acids from Nondigestible Carbohydrate Fermentation. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 576–589, 2019.
- AMON, M. et al. A farm scale study on the use of De-Odorase® for reducing odour and ammonia emissions from intensive fattening piggeries. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2–3, p. 163–169, 1995.
- ANGUITA, M. et al. Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: Use of cannulated pigs and in vitro fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2766–2778, 2006.
- AOAC, A. of O. A. C. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. **Aoac**, n. February, p. 3172, 2005. Disponível em: <[https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product\\_id=1937367](https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product_id=1937367)>.
- BARRY, K. A. et al. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978–2987, 2010.
- BARRY, K. A. et al. Adaptation of healthy adult cats to select dietary fibers in vivo affects gas and short-chain fatty acid production from fiber fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3163–3169, 2011.
- BELOSHAPKA, A. N. et al. Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. **American journal of veterinary research**, v. 73, n. 7, p. 1016–1023, 2012.
- BIAGI, G. et al. Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 1–2, p. 50–58, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.04.012>>.
- BIANCHI, F. et al. Modulation of gut microbiota from obese individuals by in vitro fermentation of citrus pectin in combination with Bifidobacterium longum BB-46. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8827–8840, 2018.
- BLAKE, A. B. et al. Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, p. 1–21, 2019.
- BOSCH, G. et al. Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 2979–2989, 2008.
- BOSCH, G. et al. Effects of preservation conditions of canine feces on in vitro gas production kinetics and fermentation end products. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 1, p. 259–267, 2013.
- BOSCH, G. et al. Evaluation of an in vitro fibre fermentation method using feline faecal inocula: repeatability and reproducibility. **Journal of Nutritional Science**,

v. 6, n. 25, p. 1–4, 2017a.

BOSCH, G. et al. Evaluation of an in vitro fibre fermentation method using feline faecal inocula: inter-individual variation. **Journal of nutritional science**, v. 6, n. 24, p. 1–4, 2017b.

BUI, T. P. N. et al. Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructoselysine by a human gut commensal. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10062>>.

CALABRÒ, N. M. S.; CUTRIGNELLI, M. I. In vitro evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall fermentability using a dog model. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. September 2017, p. 24–30, 2018.

CALABRÒ, S. et al. Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in vitro gas production technique. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 2008, p. 21–27, 2013.

CATTANI, M. et al. Technical note : In vitro total gas and methane production measurements from closed or vented rumen batch culture systems. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1736–1741, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7462>>.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 421–444, 2005.

COLLINS, S. B. et al. Development of a technique for the in vivo assessment of flatulence in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1014–1019, 2001.

CORREA-BETANZO, J. et al. **Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014. v. 165

CZAUDERNA, M.; KOWALCZYK, J. Lactic acid can be easily and precisely determined by reversed-phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 17, n. 2, p. 268–279, 2008.

DANIEL, M. et al. Fermentation in human subjects of nonstarch polysaccharides in mixed diets, but not in a barley fiber concentrate, could be predicted by in vitro fermentation using human fecal inocula. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 10, p. 1981–1988, 1997.

DANIELSSON, R. et al. Evaluation of a gas in vitro system for predicting methane production in vivo. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8881–8894, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12675>>.

DAVILA, A. M. et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. **Pharmacological Research**, v. 68, n. 1, p. 95–107, 2013.

DE GODOY, M. R. C.; KERR, K. R.; FAHEY, G. C. Alternative dietary fiber sources in companion animal nutrition. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 3099–3117, 2013.

DOS REIS, J. S. et al. Inclusion of *Yucca schidigera* extract in diets with different

- protein levels for dogs. **Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho**, v. 87, n. 8, p. 1019–1027, 2016.
- DOS SANTOS FELSSNER, K. et al. Dietetic combination of mannan-oligosaccharides and fructooligosaccharides modifies nitrogen metabolism in dogs. **Semina: Ciencias Agrarias**, v. 37, n. 5, p. 3335–3347, 2016.
- DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5810–5817, 2004.
- EDWARDS, C. A. et al. In vitro method for quantification of the fermentation of starch by human faecal bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 71, n. 2, p. 209–217, 1996.
- FEHLBAUM, S. et al. In Vitro Fermentation of Selected Prebiotics and Their Effects on the Composition and Activity of the Adult Gut Microbiota. **International journal of molecular science**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 2018.
- FLICKINGER, E. A. et al. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1267–1273, 2000.
- GARCIA-MAZCORRO, J. F.; MINAMOTO, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: A brief review. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 45, n. 2, p. 111–124, 2013.
- GIFFARD, C. J. et al. Administration of charcoal, *Yucca schidigera*, and zinc acetate to reduce malodorous flatulence in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 6, p. 892–896, 2006.
- GOMEZ, E. et al. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 2114–2121, 2010.
- GUEVARA, M. A. et al. Chemical composition, in vitro fermentation characteristics, and in vivo digestibility responses by dogs to select corn fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1619–1626, 2008.
- HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5–6, p. 205–209, 2007.
- HESTA, M. et al. The effect of oligofructose on urea metabolism and faecal odour components in cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, n. 3–6, p. 208–214, 2005.
- HOUDIJK, J. **Effects of non-digestible oligosaccharides in young pig diets.** [s.l: s.n.]
- HOVELL, I. et al. The use of EDTA in alkaline zinc acetate solutions as a trapping mixture for hydrogen sulphide. (ABPG, Ed.) In: PDPETRO, Campinas, SP. **Anais...** Campinas, SP: 2007.
- HUGHES, M. N.; CENTELLES, M. N.; MOORE, K. P. Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1346–1353, 2009.

HUR, S. J. et al. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–12, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>>.

HURST, N. . et al. The Short Chain Fatty Acids, Butyrate and Propionate, have Differential Effects on the Motility of the Guinea Pig Colon. **Neurogastroenterology Motility**, v. 26, n. 11, p. 1586–1596, 2014.

HUSSEIN, H.; FAHEY, G. C. In Vitro Fermentation of Cellulose , Beet Pulp , Citrus Pulp , and Citrus Pectin Using Fecal Inoculum from Cats , Dogs , Horses , Humans , and Pigs and Ruminal Fluid from Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. December, p. 3639–3648, 1995.

INNESS, V. L. et al. Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 1–2, p. 48–53, 2007.

INNESS, V. L. et al. Use of static batch culture systems to investigate the fermentation effects of selected oligosaccharides and fibres by the canine faecal microiota. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 6, n. 1, p. 57–64, 2011.

JANNINK, K. et al. An in vitro approach to quantify protein fermentation using ileal digesta of pigs. In: Wias Annual Conference 2020, **Anais...2020**.

JI, H. et al. In vitro gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 19, p. 5349–5371, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1884841>>.

KANAKUPT, K. et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1376–1384, 2011.

KENDRICK, J. et al. A novel welfare and scientific approach to conducting dog metabolism studies allowing dogs to be pair housed. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 6, p. 588–598, 2020.

KUCUKKURT, I. et al. The effects of dietary supplementation of different amount of *Yucca schidigera* powder (Sarsaponin 30??) on blood and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 11, p. 1413–1417, 2008.

LEWIS, S. et al. Effects of metronidazole and oligofructose on faecal concentrations of sulphate-reducing bacteria and their activity in human volunteers. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 40, n. 11, p. 1296–1303, 2005.

LIU, D. **In vitro evaluation of fermentation kinetics and end-product profiles of several substrates using cat fecal inocula**. 2011. Ghent University, 2011.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29–41, 2017.

LOWE, J. A. et al. The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. **Research**



in **Veterinary Science**, v. 63, p. 67–71, 1997.

LOWMAN, R. S.; THEODOROU, M. K.; HYSLOP, J. J. Evaluation of an in vitro batch culture technique for estimating the in vivo digestibility and digestible energy content of equine feeds using equine faeces as the source of microbial inoculum. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 1, p. 11–27, 1999.

MABJEESH, S. J.; COHEN, M.; ARIELI, A. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: Comparison of methods and inoculum source. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2289–2294, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75115-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75115-0)>.

MARTÍN-PELÁEZ, S. et al. In vitro fermentation of carbohydrates by porcine faecal inocula and their influence on Salmonella Typhimurium growth in batch culture systems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 608–619, 2008.

MCBURNEY, M. I.; THOMPSON, L. U. Effect of human faecal inoculum on in vitro fermentation variables. **British Journal of Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 233–243, 1987.

MEINER, G. et al. Effects of “fresh mechanically deboned meat” inclusion on nutritional value, palatability, shelf-life microbiological risk and digestibility in dry dog food. **PLoS ONE**, v. 16, n. 4 April, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0250351>>.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MONTOYA, C. A.; DE HAAS, E. S.; MOUGHAN, P. J. Development of an in vivo and in vitro ileal fermentation method in a growing pig model. **Journal of Nutrition**, v. 148, n. 2, p. 298–305, 2018.

MORINE, S. J. et al. Determining the influence of dietary roughage concentration and source on ruminal parameters related to sulfur toxicity. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 9, p. 4068–4076, 2014.

MORTENSEN, P. B. et al. Fermentation to short-chain fatty acids and lactate in human faecal batch cultures intra- and inter-individual variations versus variations caused by changes in fermented saccharides. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 12, p. 1285–1294, 1991.

NOACK, J. et al. Fermentation profiles of wheat dextrin, Inulin and partially hydrolyzed guar gum using an in Vitro digestion pretreatment and in Vitro batch fermentation system model. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p. 1500–1510, 2013.

ONEL, S. E. et al. The effect of Origanum syriacum L. extract and carvacrol on the in vitro digestion, estimated digestion values, ammonia and organic acid concentrations in the fermentation fluid of lucerne herbage. **Veterinarni Medicina**, v. 67, n. 6, p. 309–315, 2022.

PAYNE, A. N. et al. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 17–25, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>>.

PEACHEY, S. E.; DAWSON, J. M.; HARPER, E. J. Gastrointestinal transit times in young and old cats. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 126, n. 1, p. 85–90, 2000.

- PÉREZ-BURILLO, S. et al. Effect of in vitro digestion-fermentation on green and roasted coffee bioactivity: The role of the gut microbiota. **Food Chemistry**, v. 279, p. 252–259, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.137>>.
- PINNA, C. et al. An in vitro evaluation of the effects of a *Yucca schidigera* extract and chestnut tannins on composition and metabolic profiles of canine and feline faecal microbiota. **Archives of Animal Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 395–412, 3 set. 2017.
- PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **The Analyst**, v. 94, p. 1151–1152, 1969.
- RABA, G.; ADAMBERG, S.; ADAMBERG, K. Acidic pH enhances butyrate production from pectin by faecal microbiota. **FEMS microbiology letters**, v. 368, n. 7, p. 1–8, 2021.
- RIOS-COVIAN, D. et al. An Overview on Fecal Branched Short-Chain Fatty Acids Along Human Life and as Related With Body Mass Index: Associated Dietary and Anthropometric Factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–9, 2020.
- RIVAS, L. et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 70–78, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.029>>.
- ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. SUPPL.2, 2010.
- ROCHUS, K. et al. Incubation of selected fermentable fibres with feline faecal inoculum: correlations between in vitro fermentation characteristics and end products. **Archives of Animal Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 416–431, 2013.
- ROCHUS, K.; JANSSENS, G. P. J.; HESTA, M. Dietary fibre and the importance of the gut microbiota in feline nutrition: A review. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 2, p. 295–307, 2014.
- ROQUE, N. C. et al. Increasing levels of zeolite and yucca schidigera in diets for adult cats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2471–2475, 2011.
- RYMER, C. et al. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 9–30, 2005.
- SANTOS, J. P. F. **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.
- SILVA JUNIOR, CABRAL FILHO S, SILVA F, SILVA K, CABRAL A, B. T.; COSTA F, NAVARRO R, M. L. Utilização da técnica in vitro semiautomática de produção de gases na avaliação da fermentação microbiana do ceco de suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 252–257, 2018.
- SINGER, M. D. et al. Impacts of rumen fluid modified by feeding *Yucca schidigera* to lactating dairy cows on in vitro gas production of 11 common dairy feedstuffs, as well as animal performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 3–4, p. 242–258, 2008.

SINGH, S.; LIN, H. Hydrogen Sulfide in Physiology and Diseases of the Digestive Tract. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 866–889, 2015.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 10, p. 2505–2514, 2003.

SMITH, E. A.; MACFARLANE, G. T. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: Effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, n. 4, p. 355–368, 1998.

SUNVOLD, G. D. et al. Dietary fiber for cats: in vitro fermentation of selected fiber sources by cat fecal inoculum and in vivo utilization of diets containing selected fiber sources and their blends. **Journal of animal science**, v. 73, n. 8, p. 2329–2339, 1995.

SWANSON, K. S. et al. Effects of Supplemental Fructooligosaccharides and Mannan-oligosaccharides on Colonic Microbial Populations, Immune Function and Fecal Odor Components in the Canine. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1717S-1719S, 2002.

TAZOE, H. et al. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. SUPPL.2, p. 251–262, 2008.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185–197, 1994.

VAN DEN ABEELE, P. et al. Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. **Journal of animal science**, v. 98, n. 6, p. 1–10, 2020a.

VAN DEN ABEELE, P. et al. Yeast-Derived Formulations Are Differentially Fermented by the Canine and Feline Microbiome As Assessed in a Novel in Vitro Colonic Fermentation Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 13102–13110, 2020b.

VERHOECKX, K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I. In vitro fermentation models: General introduction. In: CHAM, C. (Ed.). **The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models**. 1. ed. [s.l.: s.n.]p. 275–279.

VIERBAUM, L. et al. In vitro evaluation of the effects of *Yucca schidigera* and inulin on the fermentation potential of the faecal microbiota of dogs fed diets with low or high protein concentrations. **Archives of Animal Nutrition**, v. 73, n. 5, p. 399–413, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1616498>>.

VITAL, M.; HOWE, A. C.; TIEDJE, J. M. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. **mBio**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2014.

WEAVER, G. A. et al. Constancy of glucose and starch fermentations by two different human faecal microbial communities. **Gut**, v. 30, n. 1, p. 19–25, 1989.

WILLIAMS, B. A. et al. An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. **Animal Feed Science**

**and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 445–462, 2005a.

WILLIAMS, B. A. et al. In vitro assessment of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. **Animal Research**, v. 54, n. June, p. 191–201, 2005b.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, v. 14, n. 02, p. 207, 2001.

WILLIAMS, C. F. et al. Comparative analysis of intestinal tract models. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. February, p. 329–350, 2015.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. E140–E148, 2008.

WONG, J. M. W. et al. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235–243, 2006.

XU, M. et al. *Yucca schidigera* extract decreases in vitro methane production in a variety of forages and diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 1–2, p. 18–26, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.05.005>>.

YUNILAS et al. Potency of indigenous bacteria from oil palm waste in degrades lignocellulose as a sources of inoculum fermented to high fibre feed. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 12, n. 9, p. 851–853, 2013.

#### 4. CAPÍTULO 3.

### **Avaliação de um modelo estático *in vitro* para a determinação da digestibilidade e produtos de fermentação *in vivo* em dietas extrusadas para gatos**

Fernando González<sup>1</sup>, Márcia Gomes<sup>1</sup>, Ricardo Vasconcellos<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo, Av. Prof. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP, 13690-970, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Av. Prof. Colombo, 5.790, Maringá, PR 87020-900, Brasil

\* Correspondência: ricardo.souza.vasconcellos@gmail.com

#### RESUMO

É tendência mundial reavaliar o uso de animais em experimentos visando reduzi-  
os ou substituí-los para determinados testes usando modelos que não  
necessitem de animais. O presente estudo em dois experimentos comparou os  
resultados de metodologias *in vivo* e *in vitro* de dezenove rações para gatos com  
o objetivo de determinar se as metodologias *in vitro* podem prever os  
resultados de digestibilidade e fermentação *in vivo*. O experimento 1, comparou  
na primeira etapa, o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca  
(CDAMS) e da matéria orgânica (CDAMO) com seus resultados *in vitro*; na  
segunda etapa, os mesmos coeficientes foram comparados com os resultados  
da fermentação *in vitro* (FIV), que usou o resíduo das rações após de um  
processo de digestibilidade *in vitro* (DIV) como substrato de fermentação. O  
Experimento 2, comparou produtos de fermentação *in vivo* com os obtidos *in*  
*vitro*. Os resultados do experimento 1 apresentaram semelhanças ( $p \leq 0,01$ ) e  
correlação forte ( $r=0,789$ ) entre o CDAMO e a DIV da MO e deferindo  
significativamente nas outras metodologias comparadas. No experimento 2,  
apesar de ter diferenças significativas entre as metodologias, os ácidos graxos  
de cadeia curta (AGCC) acetato e butirato e o pH tiveram correlações positivas  
entre metodologias ( $r = 0,596, 0,541$  e  $0,576$ , respectivamente). A razão molar  
dos AGCC deferiu entre metodologias, apresentando mais semelhança a  
metodologia *in vivo* (61:15:8) que a *in vitro* (35:16:13) quando comparadas com  
outros estudos (60:20:10) e com aumento na razão de ácidos graxos de cadeia  
ramificada (AGCR) para ambas as metodologias (16% *in vivo* e 36% *in vitro*)

tendo como referência níveis máximos de 10%. A metodologia de DIV da MO pode ser usada como método substitutivo do CDAMO, embora sua validação ainda seja necessária. Os produtos de fermentação in vitro pH, acetato e butirato, mostraram ser bons preditores de direcionamento in vivo, que simulam suas tendências fecais, mas não a concentração. Apesar das correlações entre metodologias in vivo e in vitro para digestibilidade da MS e MO, os resultados necessitam uma interpretação cuidadosa. Em gatos a falta de padronização das metodologias e a incapacidade para responder questões específicas relacionadas à fisiologia da digestão e comportamentos fermentativos, deixa um vasto espaço para futuros estudos e melhorias.

**Palavras-chave:** 1; correlação 2; matéria orgânica 3; matéria seca 4; produtos fermentação 5; incubadora 6; felino

## Evaluation of an *in vitro* static model for the determination of *in vivo* digestibility and fermentation products in extruded diets for cats

Fernando González<sup>1</sup>, Márcia Gomes<sup>1</sup>, Ricardo Vasconcellos<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP) – São Paulo, Av. Prof. Prof. doctor Orlando Marques de Paiva, 87, Sao Paulo, SP, 13690-970, Brazil

<sup>2</sup> Department of Animal Science, State University of Maringá, Maringá, Av. Prof. Colombo, 5790, Maringá, PR 87020-900, Brazil

\* Correspondence: ricardo.souza.vasconcellos@gmail.com

### ABSTRACT

It is a worldwide trend to reassess the use of animals in experiments to reduce or to replace them for certain tests using models that do not require animals. The present study in two experiments compared the results of *in vivo* and *in vitro* methodologies of nineteen cat diets to determine if the *in vitro* methodologies can predict the results of *in vivo* digestibility and fermentation. Experiment 1. compared in the first stage, the apparent digestibility coefficient of dry matter (ADCDM) and organic matter (ADCOM) with their *in vitro* results; in the second stage, the same coefficients were compared with the results of *in vitro* fermentation (IVF), which used of each extruded diet the residue after an *in vitro* digestibility process (IVD) as a fermentation substrate. Experiment 2 compared *in vivo* fermentation products with those obtained *in vitro*. The results of experiment 1 showed similarities ( $p \leq 0.01$ ) and strong correlation ( $r = 0.789$ ) between ADCMO and IVD of OM, differing significantly the other compared methodologies. In experiment 2, despite having significant differences between methodologies, the short-chain fatty acids (SCFA) acetate and butyrate and pH had positive correlations between methodologies ( $r = 0.596, 0.541$  and  $0.576$ , respectively). The SCFA molar ratio differed between methodologies, showing more similarity to *in vivo* methodology (61:15:8) than *in vitro* (35:16:13) when compared to other studies (60:20:10) and with an increase in ratio of branched chain fatty acids (BCFA) for both methodologies (16% *in vivo* and 36% *in vitro*) with maximum levels of 10% as reference. The OM DIV methodology can be used as a substitute predictable method for CDAOM, although its validation is needed. The *in vitro* fermentation products pH, acetate, and butyrate have been shown to be good predictor of *in vivo* targeting, which simulate their faecal

tendencies but not concentration. Despite correlations between *in vivo* and *in vitro* methodologies for DM and OM digestibility, the results require careful interpretation. In cats, the lack of standardization of methodologies and the inability to answer specific questions related to the physiology of digestion and fermentative behaviors, leaves a vast space for future studies and improvements.

Keywords: 1; correlation 2; organic matter 3; dry matter 4; fermentation products 5; incubator 6; feline



#### 4.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da digestibilidade dos alimentos é fundamental na determinação da qualidade nutricional. O método mais empregado para sua determinação é o método *in vivo* (FEDIAF, 2020). No entanto, este método tem alguns problemas, pois ignora as perdas endógenas de nutrientes e secreções digestivas, assumindo que tudo o que está presente nas fezes é excreta não aproveitada do alimento e não diferencia as frações que sofreram digestão enzimática no intestino delgado e fermentação pela microbiota do intestino grosso. Apesar dos problemas relatados, dada a sua maior simplicidade de realização, a determinação da digestibilidade total aparente pelo método *in vivo* é considerada o método de referência em cães e gatos, cujos protocolos são recomendados por órgãos oficiais como a AAFCO (2020) nos Estados Unidos, FEDIAF (2021) na Europa e ABINPET (2020) no Brasil.

Apesar dos ensaios *in vivo* serem considerados referência, estes métodos apresentam um custo relativamente elevado de manutenção de animais e infraestrutura em condições adequadas de pesquisa para a realização dos ensaios (SENGER et al., 2007). É tendência mundial reavaliar o uso de animais em experimentos, estando em constante mudança os modos que são realizadas as pesquisas experimentais que os envolvem. Um dos conceitos mais relevantes foi apresentado (RUSSELL; BURCH, 1959) como o princípio dos 3Rs na experimentação animal, referindo-se aos conceitos de redução, substituição e refinamento na utilização de animais no meio científico. Os autores sugerem que é importante considerar métodos que refinam as técnicas, visando eliminar ou minimizar a dor e estresse, que reduzam o número de animais para determinados testes, e a possível substituição e utilização de modelos que não necessitem de animais, os autores apontam que na substituição não são necessários animais em nenhum procedimento, sendo considerada um ideal absoluto. Estudos relacionados com nutrição em animais estão desenvolvendo e aprimorando o uso de técnicas entre elas as *in vitro* para aplicar a substituição e utilização de modelos que não necessitem de animais. Os modelos de digestão e fermentação do trato gastrointestinal *in vitro* possuem as vantagens de reprodutibilidade, simplicidade, universalidade e podem simular muitas das condições *in vivo*, que imitam os processos digestivos orais, gástricos, do

intestino delgado e do intestino grosso (JI et al., 2022), ressaltando que, apesar da ampla adoção desses conceitos por pesquisadores, as alternativas *in vitro* comprovadas, reais e aceitas para fins de substituir os testes em animais ainda são consideradas uma meta e não uma realidade (CERONI; CORRÊA; DUQUE, 2004). Os modelos *in vitro* foram desenvolvidos principalmente para imitar a fisiologia digestiva, mas são cada vez mais adaptados para simular a os processos digestórios do animal; esses modelos *in vitro* podem ser não apenas baratos, simples e versáteis, mas também convenientes para amostragem e alta reprodutibilidade de resultados, o que tem sido amplamente utilizado na avaliação dos alimentos e seus componentes (JEONG et al., 2019).

As comparações entre ambas metodologias (*in vivo* e *in vitro*) tem sido exploradas em estudos, sem aparente correlação entre elas (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005; GUERRA et al., 2012; VERHOECKX; COTTER; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2015; BOHN et al., 2018). Embora existam estudos validados em humanos comparando quantitativamente os resultados finais de alguns nutrientes como amido resistente (HASJIM et al., 2010) e outros estudos em proteínas validando protocolos estáticos *in vitro* (EGGER et al., 2017), os autores referem que eles podem simplificar demais o mecanismo de digestão intestinal, sendo que reações enzimáticas na digestão *in vitro* são realizadas apenas em solução/suspensão homogênea, enquanto a digestão intestinal ocorre no lúmen intestinal e na superfície da parede intestinal. Além disso, há mais enzimas envolvidas na digestão intestinal que na digestão *in vitro*; indicando que os resultados da digestão *in vitro* podem não refletir exatamente os da digestão *in vivo*. No gato existem poucos estudos comparando as metodologias *in vitro* como preditoras dos produtos *in vivo*. Num estudo (SUNVOLD et al., 1995a), foram formuladas fibras nas rações baseando-se nos resultados *in vitro*, e concluíram, que a técnica de fermentação *in vitro* foi razoavelmente precisa na previsão da digestão *in vivo* da fibra.

O objetivo do presente estudo foi comparar os coeficientes de digestibilidade aparente em trato digestório total da matéria seca e matéria orgânica de rações para gatos obtidos *in vivo* com os valores obtidos por meio de procedimento *in vitro*, bem como a concentração de produtos de fermentação verificadas nas fezes de gatos com os obtidos pela fermentação *in vitro* a partir de inóculo fecal de gatos.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Local de condução

Para este estudo foram utilizados como referência os resultados do coeficiente de digestibilidade aparente da MS (CDAMS) e MO (CDAMO) e produtos de fermentação fecal de 19 alimentos extrusados para gato em 4 estudos diferentes, que foram conduzidos no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Felinos, localizado na fazenda experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição. Neste estudo foram realizados dois experimentos. No experimento 1, os CDAMS e orgânica CDAMO *in vivo* de 19 rações, foram comparados com aqueles determinados por duas metodologias *in vitro*. No experimento 2, os resultados de produtos de fermentação fecal de gatos alimentados com as 19 rações, foram comparados com produtos de fermentação *in vitro*, visando estabelecer correlações entre estes dois métodos.

A tabela 1, apresenta a análise bromatológica das 19 rações empregadas para os dois experimentos.

Tabela 1. Composição química analisada na matéria seca das rações utilizadas nos experimentos

Dietas	Umidade (%)	Matéria Seca (%)	Matéria Orgânica (%)	Matéria Mineral (%)	Proteína Bruta (%)	Fibra Bruta (%)	EEHA (%)	Energia Bruta (kcal/kg)
1	7,20	92,80	90,60	9,40	28,60	3,51	12,22	4345
2	7,30	92,70	90,40	9,60	28,70	3,62	12,84	4368
3	7,30	92,70	90,60	9,40	28,70	3,58	12,69	4376
4	10,18	89,82	89,54	5,59	22,38	2,30	12,63	3984
5	9,84	90,16	89,72	5,59	22,86	2,30	12,19	3984
6	9,83	90,17	89,18	5,59	30,00	2,30	12,38	3984
7	9,36	90,64	89,49	5,59	30,00	2,30	11,74	3984
8	9,46	90,54	88,78	5,58	38,00	2,30	12,11	3984
9	8,75	91,25	89,02	5,79	38,00	2,30	11,36	3984
10	7,78	92,22	85,44	14,56	27,98	4,86	11,16	4162
11	7,78	92,22	84,45	15,55	27,18	4,86	11,58	4125
12	7,67	92,33	84,69	15,31	27,32	4,86	10,98	4124
13	7,38	92,62	84,42	15,58	27,42	4,86	10,46	4159
14	6,14	93,86	93,99	6,00	29,66	2,60	10,82	4664
15	6,32	93,68	95,03	4,97	31,16	2,99	10,59	4694
16	6,48	93,52	95,18	4,82	29,94	2,13	10,89	4644
17	7,59	92,41	94,57	5,43	29,82	2,18	10,39	4614
18	7,00	93,00	94,85	5,15	30,35	2,44	10,71	4679
19	7,91	92,09	94,47	5,52	29,58	2,92	10,58	4584

Fonte: Carelli (2022)

EEHA: Extrato etéreo por hidrólise ácida

#### 4.2.2. Experimento 1. Comparação da CDMS e CDMO entre o método in vivo e dois métodos in vitro.

##### 4.2.2.1. Ensaio in vivo

Os CDAMS e da CDAMO foram determinados pelo método de coleta total de fezes sem coleta de urina (FEDIAF, 2018), e os gatos passaram por cinco dias de adaptação à dieta, seguidos de seis dias de coleta. As fezes foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15° C) até posterior análise. Ao final do período experimental, as fezes foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal (*pool* de fezes). As fezes foram secas em estufa a 55°C durante 72 horas, e logo após moídas em moinho de bola e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da UEM. Assim como as dietas, as fezes foram

analisadas para análise bromatológica sendo apenas usado neste estudo os teores de matéria seca (MS, método 935.29) e matéria mineral (MM, método 942,05); a matéria orgânica (MO) determinada como porcentagem da diferença entre MS-MM (AOAC, 2005).

Com base nos resultados laboratoriais, os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

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

CDA: coeficiente de digestibilidade aparente

#### 4.2.2.2. Digestibilidade pelo método *in vitro* sem considerar a etapa de fermentação (FIV)

A técnica de digestibilidade usada (HERVERA et al., 2007) foi modificada pela não adição do antibiótico (Cloranfenicol) e pela utilização de 0,75g de ração para gatos. Em resumo, a solução digestora foi composta de 25 mL de solução tampão fosfato de ácido ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) com sua base conjugada ( $\text{K}^2\text{HPO}_4$ ), usando 36,510 UI de pepsina (P7125, Sigma Aldrich) como primeira enzima e adicionando 10 mL de 0,2 M de HCl ajustando a solução com a ração para pH 2, a solução foi levemente agitada em banho maria (39°C) por 2 horas, depois foi adicionado 10 mL de tampão fosfato, 5 mL de NaOH 0,6 M e 100 mg. pancreatina (P1500, Sigma Aldrich) ajustado para pH 6,8, os frascos com solução e amostras, foram levemente agitados em banho maria e mantidos em temperatura constante (39°C) por 4 horas. No final da incubação, foi adicionado 5 ml de ácido sulfosalicílico 20% deixando agir por 30 minutos e o resíduo foi coletado em cadinhos de vidro tipo Gooch 2D (Laborglas, São Paulo, Brasil) enxaguados em água destilada e posteriormente lavados em 20 mL de álcool etílico e 20 mL de acetona. Para determinar os teores de MS, MM e MO foi usada a mesma metodologia que a empregada para determinar CDA e para determinar digestibilidade foi usada a seguinte equação:

$$\text{DIV}\% = \left( \frac{\text{peso inicial nutriente (g)} - \text{peso nutriente resíduo (g)}}{\text{peso inicial nutriente (g)}} \right) \times 100$$

DIV: digestibilidade in vitro (Hervera et al., 2007 modificado)

#### 4.2.2.3. Determinação do CDMS e CDMO pela DIV seguida pela etapa de fermentação in vitro (FIV).

Para a obtenção do substrato para a FIV, a metodologia de digestão usada (MEINERI et al., 2021) foi modificada pela não adição do antibiótico (Cloranfenicol), foi usada a incubadora TE150 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e foram empregados sacos TNT de 80 gramas. A vantagem deste método, foi a possibilidade de digerir numa jarra, distintas rações no mesmo tempo e com capacidade de até quatro jarras por incubadora. Os autores encontraram concordância na digestibilidade da MS e MO com os resultados in vivo e a metodologia de Hervera et al., (2007), coincidindo também, com outros estudos dos mesmos autores (HERVERA et al., 2008, 2009) que apresentaram uma maior precisão para a digestibilidade aparente da proteína bruta in vivo ( $r = 0,81$ ) e energia digestível in vivo ( $r^2 = 0,94$ ). Em resumo da metodologia, as rações moídas em moinho de bola e pesadas ( $0,5 \pm 0,01$  g) foram colocadas em sacos de filtro ( $5 \times 5$  cm) de TNT de 80 gramas e colocados dentro de jarras onde foram incubadas em aparelho TE150 (Tecnal, Piracicaba, Brasil). A incubadora possui quatro jarras de digestão que rotacionam em temperatura constante e uniforme dentro de uma câmara com temperatura controlada ( $39^\circ\text{C}$ ), mantendo as soluções, dosagens e tempos da metodologia de Hervera et. al, (2007). Depois as lavagens com água, álcool metílico e acetona, os sacos TNT contendo dentro o resíduo da digestão, foram levados a estufa de ventilação forçada ( $55^\circ\text{C}$ ) por uma noite e posteriormente foram secados em estufa ( $105^\circ\text{C}$ ) finalizando a parte de secagem, após secagem foram pesados e o resíduo coletado para formar o substrato da fermentação *in vitro*. No processo de fermentação *in vitro*, como inóculo fecal foram utilizadas fezes frescas de três animais adaptados numa ração padrão, as fezes foram coletadas de forma asséptica e colocadas em tubos Falcon de 60 ml esterilizados preenchidos previamente com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Os tubos foram mantidos até por 3 horas numa garrafa térmica de transporte sob temperatura constante de  $39^\circ\text{C}$ . No laboratório, as fezes foram misturadas e diluídas em relação 1:10 (p/v) com solução salina fisiológica estéril anaeróbica (9 g/l NaCl) numa temperatura de  $39^\circ\text{C}$  e homogeneizadas por 60

segundos usando misturador manual sob corrente contínua de dióxido de carbono em condições de esterilidade formando o *pool*. O *pool* foi filtrado utilizando gaze estéril de quatro camadas e 16 fios por cm<sup>2</sup> desprezando o conteúdo sólido, o filtrado resultante formou o inóculo fecal. Cinco mililitros do inóculo foram adicionados num frasco tipo penicilina de 120 mL contendo previamente 82 mL do meio de fermentação (WILLIAMS et al., 2005) e 0,2 g do substrato, os frascos foram levados a estufa (39°C) para incubação. Após 24 horas os frascos foram retirados da estufa, foi coletado o resíduo sólido de cada frasco num cadinho de vidro tipo Gooch 2D de 50 mL (Laborglas, São Paulo, Brasil) sendo desprezadas a fase gasosa e líquida do frasco, o resíduo no cadinho foi seco em uma estufa a 105°C por uma noite e o peso foi determinado em balança analítica para determinar MS [(AOAC, 2005) método 935.29] a MM foi determinada em mufla a 450°C em 6 horas e posteriormente pesado [(AOAC, 2005) método 942,05], a MO foi determinada pela diferença entre MS e MM.

A equação para determinar a porcentagem da fermentação *in vitro* da MS e MO foi:

$$FIV\% = \left( \frac{\text{peso resíduo da DIV (g)} * \text{taxa desaparecimento do resíduo da DIV (\%)}}{\text{peso inicial nutriente (g)}} \right) \times 100$$

#### **4.2.3. Experimento 2. Comparativo dos produtos de fermentação das metodologias *in vivo* e *in vitro*.**

##### **4.2.3.1. Produtos de fermentação *in vivo*.**

Para determinação dos AGCC, as fezes frescas de cada gato, foram coletadas por defecação espontânea num recipiente plástico e 10 g de fezes foram misturados com 30 ml de ácido fórmico 16% e armazenado em geladeira a 4°C por um período 24 horas. Depois, estas soluções foram centrifugadas (Rotina 420R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Alemanha) a 4000 g por 15 minutos a 15 °C, no final da centrifugação o sobrenadante foi submetido a duas novas centrifugações e o sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf e passou por uma nova centrifugação a 14000 rotações por minuto por 15

minutos a 4 °C para posterior congelamento. Na hora das análises as amostras foram descongeladas e os AG foram analisados por cromatografia em fase gasosa (ERWIN; MARCO; EMERY, 1961) no Laboratório de Química da UEM onde, foi realizada em um cromatógrafo da marca Shimadzu (GC- Plus 2010) e o detector de ionização em chama (FID). As condições cromatográficas foram estabelecidas com base em dados da literatura e injeções testes para obter as melhores condições cromatográficas, visando maior sensibilidade na identificação dos AGCC selecionados. A coluna utilizada no cromatógrafo gasoso foi ZB-WAX-PLUS, com fase estacionária (100% polietilenoglicol) que possui polaridade alta. Foram estabelecidas as seguintes variáveis: tamanho da coluna cromatográfica (30 m x 0,32 mm), espessura do filme (0,50 µm). As temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 250 °C. A temperatura da coluna foi aquecida até 80 °C, mantida por 1 min e então aquecida novamente até 235 °C a uma taxa de aquecimento de 35 °C min<sup>-1</sup>, e em seguida mantida constante por 5.00 min, totalizando um tempo de análise de 10.29 min. O Hidrogênio (H<sub>2</sub>), com fluxo constante de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, foi utilizado como gás de arraste e o Nitrogênio como gás auxiliar (make-up) a 30 mL min<sup>-1</sup>. No detector, a chama foi produzida usando H<sub>2</sub> e ar sintético com fluxos de 40 e 400 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras foram injetadas no modo *split*, com razão 1:80 e volume de injeção de 1,0 µL. Os AGCC foram identificados por comparação do tempo de retenção dos constituintes da amostra e padrão. Foram quantificados os ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e 4-metilvalérico.

Para avaliar a concentração de amônia (NH<sub>3</sub>), foram usados os extratos preparados para determinação dos ácidos graxos antes da última centrifugação, esses extratos foram descongelados em temperatura ambiente e diluídos em água destilada (2:13 v/v) e foram coletados 2 mL da diluição com 5.0 ml de KOH 2N e colocados em aparelho do tipo micro-kjedahl, sendo o aparelho ajustado para destilar num fluxo de 2 ml/min. O destilado foi recebido em 10 mL de ácido bórico a 2% até completar um total de 50 mL, o destilado titulou-se com HCl 0.005N (VIEIRA, 1980).

Para determinar ácido láctico, foram empregados 3 gramas de fezes e diluídas em 9 ml de água destilada, a diluição foi mantida sob refrigeração por 1 dia e posteriormente, centrifugadas por 15 minutos à 15°C em 4000 g. O



sobrenadante foi preservado e o sedimento desprezado, sendo este procedimento foi repetido por três vezes. Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer (-15°C). A análise do ácido láctico foi segundo metodologia descrita por Pryce (PRYCE, 1969), pelo método de espectrofotometria com comprimento de onda 565nm, utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro. As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,1%.

O pH foi determinado no momento da coleta (K39 – 1014B, Kasvi, São José do Pinhais-PR, Brazil). usando uma diluição fezes:água miliq 1:3 (p/v) (DE SOUZA THEODORO et al., 2019).

Os produtos de fermentação *in vivo* foram expressos em mmol/kg MS fecal.

#### 4.2.3.2. Produtos de fermentação *in vitro*.

O processo usado para desenvolver a metodologia de fermentação *in vitro*, foi o mesmo empregado para determinar a MS e MO na fermentação *in vitro* do Experimento 1. Para AGCC após 24 horas de incubação, os frascos foram retirados da estufa e resfriados numa em geladeira (4°C), coletando 10 mL do liquido, sendo misturados em 30 mL de uma solução de ácido fórmico a 16% (1:3 v/v), no qual, foram precipitados a 4 °C por 72 horas na geladeira, depois centrifugados três vezes a 4000 g a 15 °C (Rotina 420R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Alemanha), por 15 min e posteriormente o sobrenadante centrifugado mais uma vez a 14000 rpm, por uma hora a 4 °C, sendo coletado o sobrenadante e congelado a -20 °C até o momento da análise da mesma forma que os AGCC da fase *in vivo*.

Para determinar amônia foi usada a metodologia de Houdijk (HOUDIJK, 1998); em resumo, foi coletada da fase liquida uma amostra de 10 mL num tubo Falcon de 15 mL sendo adicionado 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% deixando agir em repouso por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugado a 1000 G por 10 minutos e o sobrenadante coletado foi mantido sob refrigeração até o momento da análise. A determinação de amônia, foi desenvolvida pela metodologia de Indofenol para espectrofotometria (Evolution 220, TermoFischer, USA) em comprimento de onda de 630 nm com cubeta de 1 cm. O valor medido de absorbância (nm) foi transformado para concentração (µmol/l) usando a

seguinte equação lineal:

$$y = 2,2065x - 0,3565$$

onde,  $y = \text{NH}_3$  ( $\mu\text{mol/l}$ ),  $x =$  absorvância a 630 nm num valor de  $R^2 = 0,9895$

A curva padrão foi determinada usando uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,63% medindo seis pontos diferentes em absorvância de 630 nm, ajustando a curva por uma equação linear.

Para determinar ácido láctico, foram empregados 6 mL de líquido de fermentação, centrifugado por 5 minutos em 3000 rpm. O sobrenadante foi preservado e o sedimento desprezado. Após a extração, as amostras foram armazenadas em tubo Falcon de 15 mL ( $-15^\circ\text{C}$ ). A análise do ácido láctico ocorreu segundo método descrito por Pryce (PRYCE, 1969), modificado pelo não emprego do ácido fosfórico como precipitante de proteína, utilizou-se espectrofotometria (Evolution 220, TermoFischer, USA) com comprimento de onda de 565nm e branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro. As amostras foram quantificadas comparando-as com padrão de ácido láctico a 0,08%.

O valor medido de absorvância (nm) foi transformado para concentração ( $\mu\text{mol/l}$ ) usando a seguinte equação polinomial de 2º ordem:

$$y = -0,075x^2 + 0,112X + 0,0004$$

no qual,  $y = \text{Lactato}$  ( $\mu\text{mol/l}$ ),  $x =$  absorvância a 565 nm e com valor de  $R^2 = 0,998$ .

Para o pH, a determinação foi feita usando 20 mL do líquido de fermentação após o período de resfriamento em temperatura ambiente (K39 – 1014B, Kasvi, São José do Pinhais -PR, Brazil).

Os produtos de fermentação *in vitro* foram expressos em mmol/kg MO do substrato.

#### 4.2.4 Análises estatística.

Para o Experimento 1, foi realizada uma análise de variância entre as metodologias *in vivo* e *in vitro* com posterior teste de Tukey e correlação de Pearson entre as metodologias. No experimento 2, foi realizado um teste T student e correlação de Pearson entre produtos de fermentação *in vivo* e *in vitro*. Valores de  $p < 0,05$  são considerados com significância.

### 4.3. RESULTADOS.

#### 4.3.1. Experimento 1.

Na tabela 2 são apresentados os resultados obtidos com as análises da digestibilidade na MS e MO pelos métodos propostos: *In vivo*, DIV e FIV.

Tabela 2. Coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS) e matéria orgânica (CDMO) pelos métodos *in vivo*, DIV e FIV para cada alimento extrusado.

	CDMS (%)			CDMO (%)		
	<i>In vivo</i> *	DIV	FIV	<i>In vivo</i> *	DIV	FIV
1	70,7	78,0	81,6	76,6	77,1	82,4
2	69,7	78,0	82,2	75,4	77,2	82,9
3	72,3	77,9	83,6	78,4	77,2	84,0
4	85,2	86,6	89,8	88,2	87,5	90,7
5	81,2	87,7	91,8	84,3	87,8	92,4
6	82,8	79,2	83,9	85,9	78,9	83,8
7	83,5	85,9	88,0	86,5	85,8	88,2
8	85,5	87,3	89,1	88,5	87,6	89,5
9	84,0	79,4	81,2	86,9	79,4	81,7
10	77,0	86,6	88,0	84,9	84,8	87,0
11	73,7	86,1	87,4	82,6	84,4	85,5
12	77,6	87,1	88,3	85,6	85,6	87,5
13	78,5	87,1	88,5	86,4	85,4	88,0
14	85,3	87,8	90,1	88,1	88,1	90,8
15	83,2	88,3	90,8	86,5	88,1	90,2
16	84,4	88,1	90,3	87,3	88,3	91,5
17	84,8	87,6	88,8	87,8	87,4	89,5
18	85,0	88,3	89,6	87,7	88,2	90,0
19	84,3	87,6	88,5	87,1	87,3	89,2
Média	80,44	84,98	87,44	84,97	84,53	87,61
Desvio padrão	5,40	4,05	3,26	3,95	4,22	3,30

Fonte: González (2022)

\* Coeficiente de digestibilidades aparente.

DIV: Digestibilidade *in vitro* (Hervera et al., 2007)

FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005)

Na tabela 3 são apresentados os dados da análise de variância e as comparações entre as médias das digestibilidades da MS e MO do método *in vivo* e pelos dois métodos *in vitro* testados.

Tabela 3. Digestibilidade (%) da matéria seca e orgânica determinados pelos métodos *in vivo* e *in vitro*.

	In vivo*	DIV	FIV	Média	Desvio-padrão	Valor - p
CDMS	80,4 <sup>c</sup>	85,0 <sup>b</sup>	87,4 <sup>a</sup>	84,3	2,211	<0,001
CDMO	85,0 <sup>b</sup>	84,5 <sup>b</sup>	87,6 <sup>a</sup>	85,7	2,027	<0,001

Fonte: González (2022)

\* Coeficiente de digestibilidade aparente

CDMS: Coeficiente de digestibilidade da matéria seca.

CDMO: Coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica

DIV: Digestibilidade *in vitro* (Hervera et al., 2007)

FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005)

<sup>abc</sup> Médias seguidas por letras em comum na linha não diferem pelo teste Tukey a 5%.

Valores com  $p \leq 0,05$  são considerados com significância

Os valores das metodologias de CDMO ficaram mais próximos entre eles, sendo o resultado obtido pelo método DIV semelhante ao *in vivo*. Os métodos de DMS apresentaram maior valor em relação aos demais.

Para verificar a correlação entre metodologias, estabeleceu-se o teste de Pearson entre os métodos (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação de Pearson (r) e probabilidades (p\*) do método *in vivo* na MS e MO com as metodologias *in vitro*.

	DIV	FIV
In vivo MS	0,609 (p=0,006)	0,584 (p=0,009)
In vivo MO	0,789 (p=<0,001)	0,659 (p=0,002)

Fonte: González (2022)

MS: Matéria seca

MO: Matéria orgânica

DIV: Digestibilidade *in vitro* (Hervera et al., 2007)

FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005)

\*Valores com  $p \leq 0,05$  são considerados com significância

Os resultados apresentam uma correlação positiva e significativa para todas as comparações, mas os maiores coeficientes de correlação (r) foram encontrados entre a DIV e o método *in vivo*.

As equações preditivas dos CDAMS e CDAMO usando as correlações *in vitro* de DIV e FIV são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Equações de predição dos CDAMS e CDAMO das metodologias de DIV e FIV

Equação	r <sup>2</sup>
CDAMS (%) = 11,235 + 0,815 * DIV MS (%)	0,373
CDAMS (%) = -4,236 + 0,969 * FIV MS (%)	0,344
CDAMO (%) = 22,540 + 0,739 * DIV MO (%)	0,622
CDAMO (%) = 15,790 + 0,790 * FIV MO (%)	0,438

Fonte: González (2022)

CDAMS: Matéria seca

CDAMO: Matéria orgânica

DIV: Digestibilidade in vitro (Hervera et al., 2007)

FIV: Digestibilidade in vitro (Meineri et al., 2021) associado a fermentação in vitro (Williams et al., 2005)

Dentro das equações de predição, as equações para CDAMS foram muito próximas e com baixos coeficientes de determinação. A equação preditiva do CDAMO usando a metodologia DIV apresentou o coeficiente de determinação mais alto.

#### 4.3.2. Experimento 2.

Na tabela 6 são apresentados os resultados do teste T student comparando os parâmetros fermentativos nas metodologias *in vivo* e *in vitro*.

Tabela 6. Média de produtos de fermentação nas metodologias *in vivo* (mmol/kg MS fecal) e *in vitro* (mmol/Kg MO)

Parâmetro	Média in vivo	Média in vitro	DP in vivo	DP in vitro	Valor – p*
pH	6,14	6,73	0,60	0,10	<0,001
Amônia	113,90	2540,35	40,30	1035,38	<0,001
Lactato	6,48	46,71	9,57	83,79	<0,001
Acetato	402,89	2306,16	276,34	707,81	<0,001
Propionato	97,94	1044,34	65,15	215,79	<0,001
Butírate	50,96	846,28	33,18	111,95	<0,001
Isobutírate	24,55	719,03	32,42	31,35	<0,001
Valerato	26,98	745,77	33,95	58,04	<0,001
Isovalerato	47,27	785,57	50,28	73,95	<0,001
4 metil valerato	7,04	101,17	29,74	39,87	<0,001

Fonte: Gonzalez (2022)

D.P.: Desvio padrão.

\*Valores com p≤0,05 são considerados com significância

Os resultados apresentam diferenças significativas em todos os parâmetros fermentativos quando comparadas as duas metodologias.

Para verificar a correlação dos parâmetros entre metodologias,

estabeleceu-se o teste de Pearson entre os métodos *in vivo* e *in vitro* (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação dos parâmetros fermentativos entre as metodologias *in vivo* e FIV

Parâmetro	r	Valor – p*
pH	0,596	0,007
Amônia	0,169	0,489
Lactato	-0,193	0,429
Acético	0,541	0,017
Propiônico	0,345	0,148
Butírico	0,576	0,009
Isobutírico	0,344	0,149
Valérico	0,414	0,078
Isovalérico	0,302	0,209
4 metil valérico	0,148	0,544

Fonte: González (2022)

FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005)

\*Valores com  $p \leq 0,05$  são considerados com significância

Os valores para pH, ácido acético e ácido butírico, apresentaram correlação positiva e significativa entre as metodologias *in vivo* e *in vitro*

As equações preditivas dos parâmetros fermentativos *in vivo* usando a metodologia de FIV que apresentaram significância nas correlações de Pearson, são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Equações de predição e  $r^2$  dos parâmetros fermentativos com significância na correlação entre as metodologias *in vivo* e *in vitro*\*

Parâmetro	Equação	$r^2$
pH	In vivo = $-16,10 + 3,3044$ * in vitro	0,3559
Acetato	In vivo = $-99,16 + 0,21719$ * in vitro	0,2922
Butirato	In vivo = $-77,35 + 0,15154$ * in vitro	0,3322

Fonte: González (2022)

$r^2$ : coeficiente de determinação

\* Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005)

As equações preditivas dos produtos fermentativos apresentaram coeficientes de determinação baixos.

#### 4.4 DISCUSSÃO.

Foi verificado que o CDMO nos métodos *in vitro* apresentaram valores de média mais próximos ao valor de referência *in vivo* e com as melhores correlações, evidenciando a semelhança entre as duas metodologias, resultados que são compatíveis com os encontrados em Ponciano Neto (2015), que usando uma adaptação da metodologia Hervera em gatos, teve valores estatisticamente semelhantes em relação ao método *in vivo* o que demonstra adequação deste método, apesar de não passar pela etapa de fermentação intestinal. Os métodos *in vitro* para MS, apresentaram maior média que seu valor *in vivo*, não sendo semelhantes entre eles, mas guardando correlação positiva. A maior digestibilidade da MS *in vitro*, pode estar relacionada à fácil solubilização da matéria mineral (SOUTAR et al., 2021) que possivelmente faz com que estes minerais sejam mais filtrados no processo, fazendo com que ocorra uma superestimativa da digestibilidade em função da maior perda desses minerais, evento que não acontece na metodologia de digestibilidade *in vitro* da MO, onde se desconsidera as cinzas e utiliza-se apenas a MO para sua avaliação. Outra possível causa da superestimativa, radica no fato que no animal, nem toda a fração de nutriente biodisponível (solubilizada), pode ser absorvida aumentando a presença mineral nas fezes, diminuindo dessa forma a digestibilidade *in vivo*, isto relacionado que a absorção mineral do organismo, depende de fatores fisiológicos relacionados ao hospedeiro, como reservas, demandas fisiológicas (crescimento, gestação, lactação), infecções, doenças ou medicamentos, que determinam a presença ou não de ligantes promotores ou inibidores da absorção, secreção de compostos gastrointestinais luminiais e das interações que ocorrem como resultado desses fatores (DRAGO, 2022). Dessa forma, nos modelos *in vitro* estáticos, os minerais solubilizados e descartados, podem tender a superestimar aos valores de digestibilidade *in vivo*, sendo achadas repostas similares nos modelos dinâmicos (BOHN et al., 2018). Esta explicativa, concorda com um estudo (MEINERl et al., 2021) onde a digestibilidade *in vivo* da MS em duas rações para cães foi cinco pontos percentuais menor que a *in vitro* (83% vs. 88% e 82 vs. 87%), mas em contraste, um estudo (BIAGI et al., 2016) usando rações para cães, foi reportado uma média de digestibilidade *in vitro* da MS menor (70,4%), sendo esse valor mais baixo que os encontrados

neste estudo, os autores justificam essa diminuição, pela baixa digestibilidade da gordura na metodologia empregada, que foi descrita para suínos onde os níveis de extrato etéreo são menores que os das dietas para cães.

Na metodologia de FIV, os resultados foram maiores tanto para MS quanto para MO ao serem comparados com os resultados *in vivo* sendo diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey, embora o valor da média continua alta para a MO, apresentou melhor efeito de correlação que a da MS ( $r^2 = 0,659$  e  $0,584$  respectivamente). Uma das principais limitantes da FIV é simular o comportamento da microbiota do hospedeiro, adicionando essa complexidade com o número de parâmetros fermentativos que são medidos simultaneamente, tendo que muitas vezes adaptar as metodologias para melhorar as respostas (PAYNE et al., 2012). Também existem parâmetros que não podem ser analisados de forma exata, porque dependem da microbiota e das interações com o hospedeiro impossibilitando sua dosagem *in vitro*. Existem poucos estudos comparando resultados de fermentação *in vivo* e *in vitro* em animais de estimação. Num estudo em cães (GUEVARA et al., 2008), com fibras de milho obtidas por diferentes metodologias que passaram por digestão *in vitro* e posteriormente fermentadas *in vitro*, foram comparadas com a digestibilidade *in vivo* da fibra dietética total, os resultados mostraram que o ensaio de digestibilidade *in vitro* previu com precisão a digestibilidade aparente de três fibras, no entanto, subestimou uma das fibras avaliadas e superestimou outra, explicando que neste último caso, talvez uma maior quantidade de amido remanescente esteja ligado à fração de fibra, tornando-o indisponível nas condições *in vivo* e com maior disponibilidade pelas encontradas *in vitro*. Em dois estudos (SUNVOLD et al., 1995a, 1995b), um em gatos e outro em cães, foram testados diferentes tipos de fibras em fermentação *in vitro* e digestibilidade *in vivo*; para cães foi achado que, valores de digestibilidade da MO derivados de substratos fibrosos fermentados *in vitro*, previram razoavelmente o valor de sua respectiva fonte de fibra no tratamento *in vivo*, tendo correlação alta ( $r^2 = 0,93$ ;  $P < 0,01$ ) e concluindo que esses resultados, poderiam ser usados para prever a utilização de fibra *in vivo*, mas nesse estudo apresentou discordâncias para algumas fontes de fibras, amostrando valores percentuais com menor precisão como na polpa de beterraba (38,2% *in vitro* 29,0% *in vivo*), explicando que isso pode ser devido à menor concentração de fibra dietética na polpa de beterraba



que em outras fontes de fibra. Nesse mesmo estudo para gatos, a técnica de fermentação *in vitro* depois de um cálculo teórico matemático, o desaparecimento da MO foi 42,6%, estando de acordo com a digestão *in vivo* da fibra (41,1%). Nesses estudos foram comparados *in vitro* e *in vivo* dois parâmetros fermentativos diferentes (CDMO e digestibilidade da fibra) sem digestão previa dos substratos e com concentração de substrato na FIV de 10 mg/mL sendo 4 vezes maior que neste estudo, a diferença desses fatores, podem influenciar a maior digestibilidade *in vitro* apresentada neste trabalho.

Os produtos de fermentação não apresentaram semelhanças entre as metodologias *in vivo* e FIV no teste T student ( $p < 0,001$ ) dada a ampla distância das médias entre as metodologias, em média os resultados foram 15 vezes maior para FIV. Para os produtos de FIV a unidade de medida empregada foi mmol/kg/MO; estudos envolvendo produtos de fermentação *in vitro* usam unidades como mmol/g/MO, (SUNVOLD et al., 1995a, 1995b; BOSCH et al., 2008, 2013; ROCHUS et al., 2013), mmol/g/MS (CAMPBELL; WILLIAMS; EISEMANN, 2002; BARRY et al., 2011) e mmol/L (PINNA et al., 2017), neste estudo, a escolha foi selecionada para que as metodologias ficassem o mais semelhantes entre unidades (*in vitro*: mmol/kg/MO e *in vivo*: mmol/kg/MS fecal) e pelo fato que é mais lógico que a quantidade de produtos de fermentação seja maior na metodologia *in vitro* por não ter perda dos produtos por absorção ou volatilização. O pH mostra uma correlação positiva entre metodologias ( $p = 0,007$ ), com menor desvio padrão para FIV, demonstrando a robustez do sistema tampão importante para manter o pH dentro das condições fisiológicas do cólon [6-7 (MCBURNEY E VAN SOEST, 1991)], conseguindo este efeito pela produção indireta de  $\text{CO}_2$  da solução tampão de bicarbonato, impedindo uma caída do parâmetro pela natureza ácida dos AGCC produzidos durante a fermentação. Os resultados dos AGCC, os ácidos acético, e butírico, apresentaram correlações significativas entre metodologias ( $p = 0,017$  e  $0,09$ , respectivamente), e que apesar da diferença existente pelo teste T, as tendências lineares positivas geradas indicam sua concordância, este resultado não poderia ser usado como valor preditivo de concentração de cada ácido graxo, mas pode ser uma ferramenta útil em estudos *in vitro* de rações para prever a tendência dos AGCC *in vivo* (aumento ou diminuição), principalmente se o objetivo é testar ou comparar novos ingredientes ou aditivos com potencial

uso para alimentação de gatos, prescindindo o uso dos animais e em concordância com os princípios dos três erres (RUSSELL; BURCH, 1959) . Estudos comparando produção de AGCC de fermentação *in vivo* e *in vitro* não são comuns, principalmente pela dificuldade de simular *in vitro* o comportamento, interação, produção, transformação que acontecem no intestino e das limitantes dos estudos *in vivo*, nos quais, não podem ser determinados com exatidão esses compostos no animal pela a diminuição de AGCC no intestino por uma rápida absorção intestinal, atingindo uma absorção de até 95% dos AGCC produzidos, enquanto o restante 5% são secretados nas fezes e provavelmente terão perda por volatilização (DEN BESTEN et al., 2013), portanto, obtendo resultados subestimados. Uma possível estratégia para comparar as metodologias pode ser a combinação de várias técnicas: para analisar ingredientes as metodologias *in vitro* estáticas podem ser a melhor escolha; para estimar a fermentação *in vivo* de carboidratos não estruturais, os testes respiratórios parecem apropriados; para medir as concentrações de ácidos graxos individuais, técnicas diretas podem ser mais apropriadas (MILLET et al., 2010). Apesar das correlações significativas entre alguns AGCC neste estudo, a razão molar deferiu entre metodologias, apresentando mais semelhança a metodologia *in vivo* (61:15:8) que a *in vitro* (35:16:13), que a de gatos saudáveis de outros estudos (60:20:10) e um aumento na razão de AGCR para ambas as metodologias (16% *in vivo* e 36% *in vitro*) quando comparadas com gatos saudáveis (7 - 10%) (TAZOE et al., 2008; ALEXANDER et al., 2019). As diferenças mais marcantes na FIV podem estar relacionadas ao médio de cultura ou substrato usado na FIV. Estudos (SUNVOLD et al., 1995a, 1995b; HESTA et al., 2001) concluíram, que existe uma grande variabilidade de fermentabilidade entre substratos, sugerindo que substratos com composições diferentes, podem mudar a atividade bacteriana *in vitro* e serem fermentados de formas variadas mudando as proporções molares de AGCC. Um estudo (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005) concluiu que a falta de comparação e validação relevantes *in vivo* – *in vitro* talvez não seja surpreendente, dada a natureza dispendiosa e demorada dos estudos *in vivo* e a falta de similaridade *in vitro*. Existem em humanos estudos antigos que comparam a degradação de carboidratos não estruturais *in vivo* com um método de fermentação *in vitro* adaptado de ruminantes, apresentando resultados notáveis de correlação ( $r^2=$

0,72) e acrescentando, que o grau de relação melhora à medida que a fermentabilidade do substrato aumentou (DANIEL et al., 1997; WISKER et al., 1998) concluindo que, o tempo de incubação *in vitro* de 24 horas foi suficiente para mimetizar o grau de degradação de carboidratos estruturais *in vivo*; corroborando com os achados de outro estudo (BOURQUIN; TITGEMEYER; FAHEY, 1996), que descobriu, que substratos altamente fermentáveis *in vitro* eram semelhantes *in vivo*. Estas observações não são totalmente inesperadas, dado que substratos altamente fermentáveis são facilmente e quase completamente degradados, *in vitro* e *in vivo*, tornando menos provável que ocorra superestimação ou subestimação substantiva da fermentabilidade do substrato *in vitro*, sendo a fase de digestão *in vitro* menos importante para substratos altamente fermentáveis (WISKER et al., 1998), e complementando os autores, que um método *in vitro* robusto também deve ter como objetivo prever a fermentação de outros materiais que entram no intestino posterior, incluindo proteínas, gorduras e outros carboidratos, como amido resistente, açúcares e oligossacarídeos.

O método de digestão usado para formar o substrato na FIV foi a incubadora, que tem a vantagem de digerir uma maior quantidade de ração, usando sacos separados que podem digerir diferentes rações, otimizando o processo em cada frasco. Neste estudo foram usados sacos TNT (tecido não tecido traduzido do inglês “non-woven textile”) feitos de polipropileno de 80 g/m<sup>2</sup>, com tamanho máximo de poro 50 µm. Num estudo em bovinos (VALENTE et al., 2011), testando sacos em diferentes forragens, foi encontrado uma maior degradação da MS para todos os tratamentos usando sacos TNT (15,9%) quando comparados com F47 (15,08%) e também, com maior degradação da fração insolúvel que é potencialmente degradável (49,9% e 44,8%, respectivamente), efeito devido provavelmente ao tecido empregado. Em estudos em bovinos (HOLDEN, 1999; MABJEESH; COHEN; ARIELI, 2000; WILMAN; ADESOGAN, 2000; ADESOGAN, 2005) o tecido TNT usado é de 100 g/m<sup>2</sup>, que para estudos *in vitro* com rações para *pets*, pode ter um nível de filtração menor e possivelmente obter resultados *in vivo* e *in vitro* mais próximos. Outra possível causa da maior digestibilidade é a incubadora usada na etapa de digestão, num estudo (SILVA et al., 2017) em bovinos, foi observado diferenças

entre as incubadoras avaliadas, com maiores estimativas para a digestibilidade da MS tanto para forragens quanto para rações com a incubadora TE-150, isto devido provavelmente a rotação dos jarros contendo os sacos no interior, apresentando uma rotação média ( $10,82 \pm 0,15$  rpm) maior que a incubadora Daisy II® (1 rpm), essa rotação pode ter influenciado o contato entre amostra e a solução, ampliando assim as estimativas de digestibilidade, também esse estudo refere, que a incubação conjunta de amostras de diferentes composições químicas, pode acarretar a ocorrência de efeitos associativos e, desse modo, ampliar as estimativas de digestibilidade.

A versatilidade que mostram os métodos *in vitro*, geram uma grande possibilidade para seu uso conseguindo comparar diferentes respostas fermentativas entre elas e inclusive confronta-as com respostas *in vivo*, fazendo desta metodologia, uma ferramenta interessante para estudos nutricionais, mas é necessário definir os métodos mais adequados para poder comparar resultados entre diferentes estudos (BOHN et al., 2018).

#### 4.5 CONCLUSÕES.

A metodologia de DIV da MO teve semelhança significativa e correlação elevada com os resultados de CDAMO, embora sua validação ainda seja necessária, pode ser usada como método substitutivo empregando a equação gerada. Os produtos de fermentação *in vitro* pH, acetato e butirato, mostraram ser bons preditores de direcionamento *in vivo*, que simulam suas tendências fecais. Apesar das correlações positivas entre a maioria de parâmetros testados, os resultados devem ser analisados com atenção e uma interpretação cuidadosa deles é sempre necessária. As evidências em outras espécies mostram que, apesar da simplicidade dos modelos *in vitro*, eles costumam ser muito úteis na predição de resultados da digestão *in vivo*, no entanto, em *pets* a falta de padronização das metodologias e incapacidade para responder questões específicas relacionadas à fisiologia da digestão e comportamentos fermentativos, deixa um vasto espaço para futuros estudos e melhorias.

## REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM DaisyII incubators. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, n. 3–4, p. 333–344, 2005.
- ALEXANDER, C. et al. Perspective: Physiologic Importance of Short-Chain Fatty Acids from Nondigestible Carbohydrate Fermentation. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 576–589, 2019.
- AOAC, A. of O. A. C. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. **Aoac**, n. February, p. 3172, 2005. Disponível em: <[https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product\\_id=1937367](https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product_id=1937367)>.
- BARRY, K. A. et al. Adaptation of healthy adult cats to select dietary fibers in vivo affects gas and short-chain fatty acid production from fiber fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3163–3169, 2011.
- BIAGI, G. et al. A new in vitro method to evaluate digestibility of commercial diets for dogs. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 617–625, 2016.
- BOHN, T. et al. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2239–2261, 2018.
- BOSCH, G. et al. Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 2979–2989, 2008.
- BOSCH, G. et al. Effects of preservation conditions of canine feces on in vitro gas production kinetics and fermentation end products. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 1, p. 259–267, 2013.
- BOURQUIN, L. D.; TITGEMEYER, E. C.; FAHEY, G. C. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. **Nutrition Research**, v. 16, n. 7, p. 1119–1131, 1996.
- CAMPBELL, J. L.; WILLIAMS, C. V; EISEMANN, J. H. Fecal Inoculum Can Be Used to Determine the Rate and Extent of In Vitro Fermentation of Dietary Fiber Sources across Three Lemur Species That Differ in Dietary Profile: *Varecia variegata*, *Eulemur fulvus* and *Haplemur griseus* 1, 2. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. April, p. 3073–3080, 2002.
- CERONI, K. C.; CORRÊA, C. L.; DUQUE, F. A. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.
- COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to

nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 421–444, 2005.

DANIEL, M. et al. Fermentation in human subjects of nonstarch polysaccharides in mixed diets, but not in a barley fiber concentrate, could be predicted by in vitro fermentation using human fecal inocula. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 10, p. 1981–1988, 1997.

DE SOUZA THEODORO, S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–19, 2019.

DEN BESTEN, G. 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.

DRAGO, S. R. **Chapter 5. Minerals**. [s.l.] INC, 2022.

EGGER, L. et al. Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. **Food Research International**, v. 102, n. September, p. 567–574, 2017.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768–1771, 1961.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

GUEVARA, M. A. et al. Chemical composition, in vitro fermentation characteristics, and in vivo digestibility responses by dogs to select corn fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1619–1626, 2008.

HASJIM, J. et al. In vivo and in vitro starch digestion: Are current in vitro techniques adequate? **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3600–3608, 2010.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5–6, p. 205–209, 2007.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible energy value of extruded dog food: Comparison of methods. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 253–259, 2008.

HERVERA, M. et al. Prediction of digestible protein content of dry extruded dog foods: Comparison of methods. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 3, p. 366–372, 2009.

HESTA, M. et al. The effect of oligofructose and inulin on faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 85, n. 5–6, p. 135–141, 2001.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1791–1794, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)>.

HOUDIJK, J. **EFFECTS OF NON-DIGESTIBLE OLIGOSACCHARIDES IN YOUNG PIG DIETS**. 1998. Wageningen, 1998.

JEONG, M. H. et al. In vitro model for predicting acute inhalation toxicity by using a Calu-3 epithelium cytotoxicity assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 98, n. July 2018, p. 106576, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.04.002>>.

JI, H. et al. In vitro gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 19, p. 5349–5371, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1884841>>.

MABJEESH, S. J.; COHEN, M.; ARIELI, A. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: Comparison of methods and inoculum source. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2289–2294, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75115-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75115-0)>.

MEINERI, G. et al. Effects of “fresh mechanically deboned meat” inclusion on nutritional value, palatability, shelf-life microbiological risk and digestibility in dry dog food. **PLoS ONE**, v. 16, n. 4 April, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0250351>>.

MILLET, S. et al. Prediction of in vivo short-chain fatty acid production in hindgut fermenting mammals: Problems and pitfalls. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 7, p. 605–619, 2010.

PAYNE, A. N. et al. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 17–25, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>>.

PINNA, C. et al. An in vitro evaluation of the effects of a *Yucca schidigera* extract and chestnut tannins on composition and metabolic profiles of canine and feline faecal microbiota. **Archives of Animal Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 395–412, 3 set. 2017.

PONCIANO NETO, B. Digestibilidade in vitro da matéria orgânica em alimentos para gatos. **XIV Congresso CBNA PET**, Ribeirão Preto - SP. 2015

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



ROCHUS, K. et al. Incubation of selected fermentable fibres with feline faecal inoculum: correlations between in vitro fermentation characteristics and end products. **Archives of Animal Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 416–431, 2013.

RUSSELL, W. M. .; BURCH, R. . **Principle of Human Experimental Techniques** LondonButler and Tanner, , 1959. .

SENGER, C. C. D. et al. Comparação entre os métodos químico , in situ e in vitro para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho. **Ciencia rural**, v. 37, n. 3, p. 835–840, 2007.

SILVA, T. E. et al. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 69, n. 6, p. 1635–1644, 2017.

SOUTAR, L. et al. Comparisons of in Vitro and in Vivo Digestibility Assays for Phosphorus in Feline Diets and Associations with Dietary Nutrient Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 36, p. 10688–10699, 2021.

SUNVOLD, G. D. et al. Dietary fiber for cats: in vitro fermentation of selected fiber sources by cat fecal inoculum and in vivo utilization of diets containing selected fiber sources and their blends. **Journal of animal science**, v. 73, n. 8, p. 2329–2339, 1995a.

SUNVOLD, G. D. et al. Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. **Journal of animal science**, v. 73, n. 4, p. 1099–1109, 1995b.

TAZOE, H. et al. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. SUPPL.2, p. 251–262, 2008.

VALENTE, T. et al. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2565–2573, 2011.

VERHOECKX, K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I. In vitro fermentation models: General introduction. In: CHAM, C. (Ed.). **The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models**. 1. ed. [s.l: s.n.].p. 275–279.

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

WILLIAMS, B. A. et al. An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 445–462, 2005.

WILMAN, D.; ADESOGAN, A. A comparison of filter bag methods with

conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 84, n. 1–2, p. 33–47, 2000.

WISKER, E. et al. Fermentation of non-starch polysaccharides in mixed diets and single fibre sources: Comparative studies in human subjects and in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 3, p. 253–261, 1998.