

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LAURA ALVES BRANDI

**Efeito de dietas com diferentes fontes de energia sobre a digestibilidade aparente,  
metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e na composição da microbiota no  
ceco e fezes de equinos**

---

Pirassununga

2023

LAURA ALVES BRANDI

**Efeito de dietas com diferentes fontes de energia sobre a digestibilidade aparente,  
metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e na composição da microbiota no  
ceco e fezes de equinos**

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Zootecnia – Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Ariboni Brandi  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

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

B818e Brandi, Laura Alves Brandi  
Efeito de dietas com diferentes fontes de energia sobre a digestibilidade aparente, metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e na composição da mi / Laura Alves Brandi Brandi ; orientadora Roberta Ariboni Brandi ; coorientadora Ricardo Luiz Moro de Sousa. -- Pirassununga, 2023. 84 f.

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

1. Cavalo. 2. Concentrado. 3. Fibra. 4. Intestino Grosso. 5. Microbioma. I. Brandi, Roberta Ariboni, orient. II. de Sousa, Ricardo Luiz Moro, coorient. III. Título.

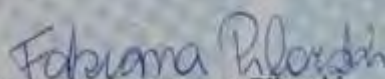
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Ação de dietas com diferentes fontes energéticas sobre o sistema digestório e a imunomodulação em equinos", protocolo nº 2057/21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Alécio Canola, 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de agosto de 2021.

Vigência do Projeto	01/09/2021 a 31/03/2022
Espécie / Linhagem	Equino
Nº de animais	6 - 8 animais
Peso / Idade	290-450 kg
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Animais provenientes de plantel experimental, lotados no setor de equinocultura da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.

  
Profa. Dra. Fabiana Pilarski  
Coordenadora – CEUA

LAURA ALVES BRANDI

**Efeito de dietas com diferentes fontes de energia sobre a digestibilidade aparente, metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e na composição da microbiota no ceco e fezes de equinos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Zootecnia – Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Ariboni Brandi  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

**Data da aprovação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

“Which is more important,” asked Big Panda, “the journey or the destination?”

“The company.” said Tiny Dragon

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof.a Dr.a Roberta Ariboni Brandi por ter me orientado e me guiado no mundo acadêmico nesses últimos oitos anos. Agradeço imensamente por todas as oportunidades que me foram dadas. Quando entrei na graduação nunca imaginei que teria chego até aqui, com um aprendizado profissional e pessoal tão grande. Serei eternamente grata.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa e todos os outros professores e equipe de laboratórios, por todo o apoio e parceria durante o experimento. Agradeço à Natalia Telles Schmidt pela amizade, parceria e suporte durante toda a jornada do mestrado. Graças a você pude entender melhor o mercado de trabalho e como a pesquisa pode contribuir para essa área.

Agradeço todas as meninas do Grupo de Pesquisa e Extensão em Equídeos e Animais de Companhia (GPEEAC), vocês foram essências para que a execução do projeto fosse um sucesso.

Agradeço ao Deco, querido funcionário da Unesp-Jaboticabal, pela contribuição no projeto e companheirismo do começo ao fim do mestrado.

Agradeço a todos os cavalos, em especial ao Ceará que permitiram a realização de um projeto tão único e que irá contribuir para a melhor qualidade de vida de muitos cavalos. Cada dia, cada noite, cada feriado, cada minuto e segundo ao lado de vocês me trouxeram muito amor e paz. Minha gratidão é inexplicável.

Agradeço à minha família, ao meu marido Breno Luis Nery Garcia, e a minha melhor amiga Arícia Fernandes por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, dos mais felizes aos mais difíceis. Me dando todo o amor de vocês para superar todos os obstáculos não só do mestrado como de minha vida.

Em especial, Breno, não tenho palavras para descrever a gratidão que tenho por ter você em minha vida. Você foi meu maior apoio, meu porto seguro durante toda essa jornada, sempre me ajudando me guiando e me levantando em todos os momentos que precisei. Nunca será possível descrever meu amor e gratidão que tenho por você.

Agradeço o apoio da FAPESP através da concessão de financiamento a projeto de pesquisa, nº de processo 2020/12753-7.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

## RESUMO

BRANDI, Laura Alves. **Efeito de dietas com diferentes fontes de energia sobre a digestibilidade aparente, metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e na composição da microbiota no ceco e fezes de equinos**. 2023. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de dietas com diferentes fontes energética sobre a digestibilidade aparente, metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e microbiota cecal e fecal em equinos. Foram utilizados cinco equinos hígidos, com ceco fixado à parede abdominal recebendo três dietas, a dieta Feno (100% feno Tifton 85), Dieta AA (amido e açúcar), e Dieta FO (fibra e óleo). Amostras fecais foram coletas para análise da digestibilidade aparente, composição da microbiota, concentração de AGCC, pH e capacidade tamponante (CT), variáveis que também foram analisadas no líquido cecal. No sangue foi determinado a concentração de AGCC. A digestibilidade aparente da dieta foi estimada com utilização de marcador externo, a lignina purificada e enriquecida (Lipe<sup>®</sup>). Para a determinação da microbiota foi utilizado o sequenciamento de nova geração (NGS) do gene 16S-rRNA. A concentração dos AGCC foi determinada por cromatografia em fase gasosa. A mensuração do pH foi realizada com um peagametro portátil e a CT foi estimada utilizando-se a seguinte fórmula  $CT (mmol/L) = Volume (mL) * 3,125$ . O experimento seguiu o delineamento experimental Cross Over. Para análise das informações da microbiota, cada microrganismo observado em determinado táxon foi utilizado modelo misto linear generalizado. Para as análises de AGCC, pH, CT, e da digestibilidade aparente adotou-se um modelo misto. Todas as análises foram realizadas pelo procedimento PROC MIXED - SAS, versão 9.4. Dietas com inclusão de concentrado AA e FO causaram redução na digestibilidade aparente da fração fibrosa. Não houve diferença significativa na produção de AGCC no ceco e fezes entre as dietas, assim como não houve diferença significativa no pH cecal entre as três dietas ( $p > 0,05$ ), mas houve diferença significativa no pH fecal, sendo menor na dieta AA ( $p < 0,05$ ). A dieta Feno apresentou maior abundância de bactéria fibrolíticas, a dieta AA teve maior abundancia de bactérias amilolíticas e a dieta FO maior abundancia de bactérias pectnolíticas, proteolíticas e lipídicas, no ceco e nas fezes. A dieta a base de FO pode substituir a dieta açúcar e amido, por apresentar semelhantes valores de



digestibilidade aparente, não alterar a concentração de AGCC no ceco, nas fezes e no sangue, não alterar o pH cecal. A alteração da abundância da microbiota cecal e fecal e da diversidade fecal, não trazem prejuízos para a saúde e para o aproveitamento da dieta pelos equinos hípidos.

**Palavras-chave:** Cavalo. Concentrado. Fibra. Intestino grosso. Microbioma.

## ABSTRACT

BRANDI, Laura Alves. **Effect of diets with different energy sources on apparent digestibility, short-chain fatty acid metabolism, and microbiota composition in the cecum and feces of horses.** 2023. 83 f. Master Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

The aim of this research was to evaluate the effect of diets with different energy sources on apparent digestibility, short-chain fatty acids (SCFA) metabolism, and cecal and fecal microbiota in horses. Five healthy horses were used, with their cecum attached to the abdominal wall, and they received three diets: the Hay diet (100% Tifton 85 hay), the SS diet (starch and sugar), and the FO diet (fiber and oil). Fecal samples were collected for analysis of apparent digestibility, microbiota composition, concentration of SCFA, pH, and buffering capacity (BC), variables that were also analyzed in the cecal fluid. SCFA concentration in the blood was determined. The apparent digestibility of the diet was estimated using an external marker, purified and enriched lignin (Lipe®). Next-generation sequencing (NGS) of the 16S-rRNA gene was used to determine the microbiota. SCFA concentration was determined by gas chromatography. pH measurement was performed with a portable pH meter, and BC was estimated using the following formula  $BC \text{ (mmol/L)} = \text{Volume (mL)} * 3.125$ . The experiment followed a Cross Over experimental design. For the analysis of microbiota information, each microorganism observed in a given taxon was used in a generalized linear mixed model. For the analysis of SCFA, pH, BC, and apparent digestibility, a mixed model was adopted. All analyses were performed using the PROC MIXED - SAS procedure, version 9.4. Diets with inclusion of SS concentrate and FO caused a reduction in the apparent digestibility of the fibrous fraction. There was no significant difference in SCFA production in the cecum and feces between the diets, and there was no significant difference in cecal pH among the three diets. However, there was a significant difference in fecal pH, being lower in the SS diet. The Hay diet had a greater abundance of fibrolytic bacteria, the SS diet had a greater abundance of amylolytic bacteria, and the FO diet had a greater abundance of pectinolytic, proteolytic, and lipolytic bacteria in the cecum and feces. The fiber and oil-based diet can replace the sugar and starch diet, as it has similar apparent digestibility values, does not alter the concentration of SCFA in the cecum, feces, and blood, and does not alter cecal pH. Altering the abundance of the cecal and fecal microbiota and fecal diversity do not harm the health and utilization of the diet by healthy horses.

**Keywords:** Horse. Concentrate. Fiber. Large intestine. Microbiome.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Características anatômicas e fisiológicas do trato digestório de equinos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Nutrientes utilizados nas dietas de equinos .....</b>	<b>13</b>
2.2.1	Carboidratos na dieta.....	13
2.2.2	Lipídeos na dieta .....	14
<b>2.3</b>	<b>Digestibilidade de dietas a base de amido e de fibra e óleo .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Microbiota em dietas alto amido e dieta fibra e óleo .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Parâmetros bioquímicos da fermentação microbiana em diferentes dietas..</b>	<b>19</b>
2.5.1	Ácidos graxos de cadeia curta.....	19
2.5.2	pH e a capacidade tamponante (CT) .....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>23</b>
	<b>Fibra e óleo vs açúcar e amido: efeito na digestibilidade, microbiota e perfil de ácidos graxos de cadeia curta em equinos.....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>CAPITULO 2 .....</b>	<b>47</b>
	<b>Dietas com diferentes fontes energéticas afetam a composição, abundancia e diversidade da microbiota cecal e fecal de equinos hígidos.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os cavalos são herbívoros que conseguem atender de 30 a 70% de suas necessidades diárias de energia a partir da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, butirato e propionato, oriundos da fermentação microbiana da fibra (FRAPE, 2004). A microbiota gastrointestinal é crucial para os equinos, uma vez que até 60% da forragem é digerido por fermentação microbiana que ocorre principalmente no intestino grosso (ceco e colón) (HANSEN et al., 2013, 2015).

Mesmo sabendo que naturalmente a base da alimenta do cavalo são alimentos volumosos, dietas ricas em grãos são comumente utilizadas para atender a exigência nutricional dos equinos (KRISTOFFERSEN et al., 2016). Equinos que ingerem mais de 1,1g de amido/kg do peso vivo por refeição, podem desenvolver problemas metabólicos e gastrointestinais (VERVUERT et al., 2009), por, este, escapar da digestão no intestino delgado e ser fermentado no intestino grosso.

Esta alteração pode levar a menor diversidade e estabilidade da microbiota causada principalmente pelo aumento de bactérias produtoras de ácido lático no intestino grosso, culminando na queda do pH e tornando o compartimento desfavorável para a proliferação das bactérias fermentadoras de fibra (celulolíticas e fibrolíticas) (HANSEN et al., 2015) e por consequência redução na degradação da fração fibrosa do alimento (DROGOUL; FOMBELLE; JULLIAND, 2001; MIRAGLIA et al., 2006) reduzindo a produção de AGCC (WARZECHA et al., 2017).

Considerando os riscos da inclusão de amido na saúde dos equinos, pesquisas na área de nutrição equina veem recomendando a utilização de dietas a base de fibras e óleo (BRAGA et al., 2008; CERBARO et al., 2020; CORREA et al., 2016; HARRIS et al., 2017). A adição de até 15% de óleo na dieta total não afeta a digestibilidade (WILLIAMS et al., 2017), e apresentou uma microbiota semelhante a dietas ricas em fibra (DOUGAL et al., 2014).

O efeito das dietas na fermentação no intestino grosso, é comumente investigado utilizando-se amostras fecais (COLLINET et al., 2021; HARLOW et al., 2016; SHEPHERD et al., 2014), as quais não podem ser consideradas representativo do intestino grosso por completo, uma vez que cada compartimento possui microbiota distinta (COSTA et al., 2012).

O conhecimento do efeito da dieta sobre a digestibilidade, composição da microbiota intestinal, no metabolismo dos AGCC, permiti desenvolver e sugerir dietas

alternativas que atendam a exigência nutricional dos equinos sem apresentar riscos a sua saúde. A utilização de dietas a base de fibra e óleo pode ser uma alternativa viável e segura para equinos, uma vez que pode apresentar digestibilidade compatível com a dieta a base de açúcar e amido (WILLIAMS et al., 2017), favorecendo a microbiota responsável pela degradação das fibras e consequentemente a produção de AGCC.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de dietas com diferentes fontes energética sobre a digestibilidade aparente, metabolismo de AGCC, e microbiota cecal e fecal em equinos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Características anatômicas e fisiológicas do trato digestório de equinos**

A boca é a entrada do trato digestório, que contém um conjunto de estruturas que auxiliam na apreensão e na alteração da estrutura física do alimento. Nesse conjunto de estruturas da cavidade oral fazem parte os lábios, língua, dentes e glândulas salivares. Os lábios móveis promovem a capacidade de seleção do alimento pelo equino, e em conjunto com a língua e dentes, é capaz de prender o alimento, sendo que os dentes incisivos superior e inferior permitem que o cavalo consiga pastar mais próximo do solo cortando a forragem (AL JASSIM; ANDREWS, 2009). O movimento mastigatório dos equinos tritura os alimentos entre os dentes molares e pré-molares por movimentos laterais da mandíbula, reduzindo o tamanho da partícula do alimento e estimulando a produção de saliva (HILLEBRANT; DITTRICH, 2015). A produção de saliva é importante, pois possibilita a deglutição, umedece o alimento e permite a ação dos sucos gástricos sobre o bolo alimentar. O equino, por ser um animal herbívoro que se alimenta principalmente de folhas, não contém enzimas digestivas em sua saliva, porém possui uma produção significativa de minerais e bicarbonato (50 mEq/L) que servem para neutralizar os ácidos na porção inicial do estômago (FRAPE, 2004).

Após a deglutição, o alimento percorre o esôfago por movimentos peristálticos chegando ao estômago. O estômago do cavalo é relativamente pequeno, compreendendo apenas 8% a 10% do trato gastrointestinal (TGI) com uma capacidade líquida de 7,5 a 15L dependendo do tipo de alimento, sendo adaptado a receber alimento em pequenas quantidades e de forma contínua (AL JASSIM; ANDREWS, 2009; BRANDI; FURTADO, 2009). É dividido em duas regiões, aglandular e glandular. Na região aglandular ocorre à fermentação sob atividade de microrganismos que degradam os carboidratos não estruturais (açúcares, amido) e proteínas, resultando na produção dos ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático e de alguns gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>). Essa região possui pH próximo de 5,4 e, com a alimentação do volumoso, maior é a produção de saliva e conseqüentemente melhor é o tamponamento dessa área do estômago, promovendo uma melhor ação do processo fermentativo pela microbiota (FRAPE, 2004). Na porção glandular, ocorre a degradação parcial das partículas sólidas pela ação do ácido clorídrico (HCL) e a digestão proteica pela ação da pepsina. O pH nesta região é de 2,6 e, para que o pH caia de 5,4 para 2,6, é importante que haja a expansão do estômago pela presença do alimento (maior expansão quando alimentado com volumoso) que estimula

a produção de gastrina, que proporcionará a maior liberação do suco gástrico que se mistura ao bolo alimentar, e do HCL, levando à queda no pH e permitindo a ação das enzimas que irão começar a digestão da proteína (HILLEBRANT; DITTRICH, 2015).

A entrada do quimo no intestino delgado (ID) estimula as secreções pancreáticas, que são contínuas onde se observam ações das tripsinas, lipase, pepsinas e amilase, porém, com baixa atividade da enzima alfa-amilase (VERVUERT et al., 2008, 2009). A secreção de bicarbonato do pâncreas e bile do fígado neutralizam o ácido clorídrico vindo do estômago, neutralizando a quimo e aumentando o pH do ID próximo a 7,0, favorecendo a atividade enzimática (AL JASSIM; ANDREWS, 2009).

Os cavalos possuem liberação constante da bile por não possuírem uma vesícula biliar; característica evolutiva relacionada ao hábito de se alimentar com pequenas quantidades de alimento de forma contínua (HILLEBRANT; DITTRICH, 2015). Este é um fator que otimiza a digestão e absorção dos lipídeos (MORGADO; GALZERANO, 2006).

O Intestino Grosso (IG) do cavalo é uma das estruturas mais importantes do trato digestivo onde há presença de microrganismos que realizam a fermentação das fibras e dos nutrientes não absorvidos no ID. Representa 60% do TGI dividido em ceco, cólon (cólon dorsal direito e esquerdo, cólon ventral direito e esquerdo e cólon menor) e reto (FRAPE, 2004). A microbiota gastrointestinal é crucial para que os nutrientes sejam eficientemente utilizados em equinos, uma vez que até 60% da forragem é degradada por fermentação microbiana (HANSEN et al., 2013, 2015).

A população de microrganismos presentes no intestino grosso de equinos, se assemelha em número e espécie à população ruminal de um ruminante. A quantidade de bactérias varia de  $0,5 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$ /g de conteúdo, sendo que as bactérias celulolíticas somam  $10^4$  a  $10^7$  g/mL e os protozoários,  $0,5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$ /mL de conteúdo (FRAPE, 2004; JULLIAND et al., 2001). O IG possui pH próximo a 6,5, considerado um pH ideal para a proliferação da microbiota responsável pelo processo fermentativo da fibra. Alterações no pH do IG podem causar a morte das bactérias fermentadoras de fibra, como as fibrolíticas e celulolíticas, reduzindo a capacidade de degradação e aproveitamento da fibra, podendo ocorrer a liberação de endotoxinas e consequentes danos à saúde do animal (SANTOS et al., 2011).



## 2.2 Nutrientes utilizados nas dietas de equinos

### 2.2.1 Carboidratos na dieta

Carboidratos são os principais constituintes das plantas forrageiras, divididos em estruturais e não estruturais, e são utilizados como fontes de energia para o cavalo (HOFFMAN, 2009). São capazes de suprir de 30 a 70% de energia de manutenção devido à produção dos AGCC, oriundo, do processo fermentativo da fibra (MENEZES et al., 2014; MORGADO et al., 2009). A origem e concentração dos carboidratos estruturais da parede celular são os principais determinantes da qualidade dos alimentos volumosos, especialmente em forragens (TEIXEIRA; ANDRADE, 2001). A parede celular pode constituir de 30 a 80% da matéria seca das plantas forrageiras, onde se concentram carboidratos como celulose, hemiceluloses e pectina (MORGADO; GALZERANO, 2008).

A presença da população de microrganismos no intestino grosso dos equinos possibilita o aproveitamento dos carboidratos estruturais da parede celular das forrageiras para obtenção de energia, e os carboidratos não estruturais, presentes no conteúdo celular (amido e açúcares- monossacarídeos e dissacarídeos) são principalmente digeridos e absorvidos no intestino delgado (SILVA et al., 2009).

Dietas ricas em amido e açúcares, por apresentar maior densidade energética comparada às forragens ricas em fibra, são utilizadas na alimentação de equinos para atender maiores exigências nutricionais (KRISTOFFERSEN et al., 2016). Devido à baixa atividade da enzima alfa-amilase, os equinos possuem limitada capacidade de digestão de amido no intestino delgado (1,1g/kg de PV/refeição) (VERVUERT et al., 2009). Quando a capacidade de ingestão é ultrapassada, parte do amido que não foi digerido atinge o IG, onde será fermentado, resultando na produção de AGCC e ácido lático, podendo causar acidificação no IG (SANTOS et al., 2011).

O oferecimento de concentrado, rico em amido, pode causar aumento de bactérias produtoras de ácido lático no IG, levando a queda do pH e tornando o compartimento desfavorável para a proliferação das bactérias fermentadoras de fibra (celulolíticas e fibrolíticas) (JULLIAND et al., 2001). A diminuição do pH resulta em menor diversidade e estabilidade microbiana, podendo causar problemas gastrointestinais como a acidose láctica, cólica e laminite (HANSEN et al., 2015). Nas dietas ricas em fibra, foi demonstrado maior estabilidade e diversidade microbiana, mantendo o pH próximo do

ideal (6,5), favorecendo o aumento bactérias fibrolíticas e celulolíticas e redução de bactérias produtoras de ácido láctico (DOUGAL et al., 2014; JULLIAND et al., 2001).

As alterações na microbiota também foram relacionadas à variação na produção de ácidos graxos de cadeia curta. Em dietas com amido, observou-se maior proporção de propionato em relação ao acetato e butirato, sendo esta relação inversa nas dietas ricas em fibras (HANSEN et al., 2015; WARZECHA et al., 2017).

### 2.2.2 Lipídeos na dieta

As principais fontes de energia são os carboidratos e os lipídeos, sendo este utilizado como fonte alternativa de energia (CERBARO et al., 2020). Os lipídeos são compostos insolúveis em água e possuem em sua composição os triglicerídeos, sendo estes formados pela ligação de moléculas glicerol com ácidos graxos de cadeia longa (NASCIMENTO et al., 2018). A digestão dos lipídios ocorre no duodeno pela ação dos sais biliares que promovem a emulsificação os lipídios, facilitando a ação da lipase pancreática que promove a lipólise dos lipídios (MORGADO; GALZERANO, 2006).

A ligação dos sais biliares com os ácidos graxos e monoglicerídeos formam as micelas, que são mais solúveis em água e como consequência, mais absorvíveis na parede do epitélio intestinal. Na parede da mucosa intestinal, os ácidos graxos e monoglicerídeo ou glicerol são reesterificados, formando os quilomicrons, que são prontamente absorvidas para dentro do sistema linfático transportando trigliceróis, fosfolipídios, colesterol, para vários órgãos e tecidos, para serem utilizados como fonte de energia ou reservas de energia (FRAPE, 2004; MORGADO; GALZERANO, 2006).

A utilização de óleos na dieta de equinos, possui vantagens como o aumento da digestibilidade, diminuição do uso de energia para produção de calor pelo cavalo, aumento do desempenho atlético, diminuição do consumo de alimento, e fornecimento de ácidos graxos essenciais (NASCIMENTO et al., 2018). Os óleos mais utilizados nas dietas são os derivados da soja e do milho por apresentarem baixo custo e maior disponibilidade no mercado (MATTOS et al., 2006). O ingrediente possui concentração média de 8,9 Mcal de energia digestível por quilograma de matéria seca, podendo elevar o valor energético da dieta, independentemente do tipo de óleo (CERBARO et al., 2020).

Tendo em vista as limitações fisiológicas do cavalo e os riscos à saúde quando há ingestão excessiva do amido, dietas à base de fibra e óleo vem sendo utilizadas, tendo em sua composição fibras capazes de gerar energia semelhantes aos grãos (WILLIAMS et

al., 2017). Essas dietas, quando comparadas com dietas alto amido, tendem a manter a produção de AGCC, sem trazer consigo os riscos de aparecimento de problemas metabólicos e gastrointestinais (CORREA et al., 2016; MENEZES et al., 2014; MIRAGLIA et al., 2006).

Estudos sugerem que a suplementação com óleo é uma alternativa para aumentar o aporte energético da dieta reduzindo os riscos de doenças e desordens digestivas encontrados em casos de alta concentração de amido (MORGADO; GALZERANO, 2006; OLIVEIRA et al., 2012; RESENDE JÚNIOR et al., 2004). Dougal et al. (2014) avaliando a caracterização da comunidade bacteriana fecal em equinos alimentados com dieta rica em fibra e óleo, observaram que a dieta rica em fibra apresentou maior diversidade da microbiota, e maiores concentrações de bactérias fibrolíticas e celulolíticas, sugerindo que dieta com inclusão de óleo promove menos riscos à saúde do equino.

### **2.3 Digestibilidade de dietas a base de amido e de fibra e óleo**

A quantidade de nutrientes nas dietas que podem ser aproveitados pelo animal é determinada através da digestibilidade aparente, que se estima à porção do nutriente ingerido pelo equino passível de ser digerido e absorvido no trato gastrointestinal (MOSS et al., 2017).

A digestibilidade dos nutrientes nos alimentos é expressa como porcentagem do nutriente que desaparece entre a ingestão e a excreção, fração do nutriente que não é recuperado nas fezes (ARAÚJO et al., 2000). Alguns fatores podem influenciar nos valores da digestibilidade, com a individualidade do equino, tempo de transito no trato digestório, composição química da dieta, nível de consumo, tipo de alimento, tamanho das partículas e quantidade de fibra na dieta (QUADROS et al., 2004). O conhecimento da digestibilidade dos nutrientes compostos na dieta, permite formular dietas mais precisas, balanceadas ou estratégias nutricionais para os equinos tenha melhor aproveitamento dos nutrientes que trazem benefícios ao cavalo (ARAÚJO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2021).

Dietas rica em amido são comumente utilizadas para atender a demanda energética dos equinos (KRISTOFFERSEN et al., 2016). O consumo de grandes quantidades de amido leva à diminuição da digestibilidades e pode causar riscos à saúde do animal (DIREKVANDI; KALANTARI, 2018). Miraglia et al. (2006) avaliando a

inclusão de concentrado comercial rico em grãos e com diferentes relações volumoso:concentrado (100:0; 75:25 e 50:50), observaram a redução da digestibilidade aparente da Fibra bruta (FB), Fibra em detergente neutro (FDN) e Fibra em detergente ácido (FDA) com o aumento do concentrado. Resultados semelhantes foram obtidos por Drogoul, Fombelle e Julliand (2001) que testando três relações volumoso:concentrado (100:0; 70:30 e 50:50), observaram que com o aumento da concentrado rico em amido houve diminuição da digestibilidade da fração fibrosa (FB, FDN, FDA) e aumento da digestibilidade da Matéria seca (MS), Energia bruta (EB) e Proteína bruta (PB). Estes autores sugerem que a redução da digestibilidade ocorreu devido a passagem do amido para o intestino grosso, causando o aumento de bactérias amilolíticas e redução das bactérias fibrolíticas.

Braga et al. (2008) avaliaram a influência de dois níveis de FDN (25 e 35%) provenientes de duas proporções de volumoso:concentrado (50:50 e 60:40) na dieta de equinos sobre a digestibilidade dos nutrientes e observaram que ao fornecer 35% FDN houve maior digestibilidade FB, FDN, FDA e EB, devido ao equilíbrio nutricional entre carboidratos estruturais e não estruturais na relação volumoso:concentrado 50:50 que pode ter influenciado na microbiota do ceco proporcionando equilíbrio entre bactérias fibrolíticas e amilolíticas. Na dieta 25% FDN, houve alteração no teor plasmático de fibrinogênio, indicando predisposição dos equinos a quadros de laminite e cólica.

Potter et al. (2021) avaliando o efeito de três dietas rica em amido, rica em fibra e rica em óleo sobre a digestibilidade dos nutrientes em equinos, observaram que a dieta rica em amido e a dieta rica em óleo apresentaram maior digestibilidade de EB, MS, FDN e PB quando comparado com a dieta rica em fibra. Resultados obtidos devido ao tempo de adaptação a dietas (20 semanas) e que o fornecimento de 278 g/kg MS de óleo aumentou a digestibilidade.

Como alternativa para equilibrar a energia proveniente da dieta e diminuir o consumo de dietas com muito carboidrato não estrutural, Williams et al. (2017) avaliaram o efeito da inclusão de 0, 5, 10 e 15% de óleo na dieta a base de fibra sobre a digestibilidade no ceco. Observaram que a inclusão de até 15% de óleo não reduz a digestibilidade de PB, FDN e FDA. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, mostrando que a adição de até 20% de óleo na dieta não apresenta diminuição do consumo ou da digestibilidade em cavalos (BRANDI et al., 2010; DOUGAL et al., 2014; MATTOS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012).

## 2.4 Microbiota em dietas alto amido e dieta fibra e óleo

O trato intestinal dos equídeos contém uma comunidade diversificada de microrganismos que consiste em fungos, parasitas, protozoários, archaea, vírus e bactérias (COSTA; WEESE, 2018). Esse conjunto de diferentes microrganismos associados a um espaço é conhecida como microbiota, enquanto sua composição genética é referida como microbioma (URSELL et al., 2012). A microbiota possui funções na fisiologia do equino, atuando no processo fermentativo dos nutrientes, no fornecimento de AGCC, e na saúde do animal (desintoxicação e proteção contra patógenos) (D'ARGENIO; SALVATORIO, 2015; MORRISON et al., 2018; WU; WU, 2012). O desequilíbrio na microbiota pode resultar em alteração dos padrões de fermentação e, em última instância, distúrbios metabólicos (DOUGAL et al., 2013)

Está bem estabelecido que a dieta modula a microbiota, porém, o conhecimento sobre como a dieta afeta a funcionalidade, estabilidade e diversidade da microbiota intestinal do equino ainda é limitado (DOUGAL et al., 2012; GARBER; HASTIE; MURRAY, 2020). Informações do efeito das dietas relacionadas à quantificação, caracterização da atividade metabólica da população microbiana no TGI de cavalo em ainda são escassos (OCHONSKI et al., 2021; SORENSEN et al., 2021).

Hansen et al. (2015), avaliando o efeito de dietas alta fibra e alto amido sobre a estabilidade, diversidade e funcionalidade da microbiota do ceco de equinos, observaram que a dieta rica em fibra apresentou maior diversidade e estabilidade da microbiota e pequena flutuação no valor do pH quando comparada à dieta rica em amido. Na dieta rica em fibra, encontraram famílias pertencentes ao filo Firmicutes como *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, que reúnem bactérias celulolíticas e fibrolíticas conhecidas pela produção de acetato e butirato. Na dieta rica em amido, foram encontradas famílias do filo Bacteroidetes (*Porphyromonadaceae*, *Bacteroidetes Cluster II* desconhecidos, *Veillonellaceae*) e filo *Proteobacteria* (*Alcaligenaceae*, *Oxalobacteraceae* e *Succinivibrionaceae*), incluindo ainda em *Proteobacteria* a classe *Deltaproteobacteria*, que são bactérias utilizadoras de ácido lático. Julliard et al. (2001) obtiveram no ceco maior concentração de bactérias utilizadoras de lactato, *Lactobacilli* spp. e *Streptococci* spp., ao utilizarem dieta rica em amido, resultando na maior queda do pH e produção de propionato, em comparação à dieta rica em fibra, que apresentou maior abundância de bactérias celulolíticas.

Com o objetivo de avaliar a caracterização da comunidade bacteriana fecal em equinos alimentados com dieta rica em fibra, alto teor de óleo ou alto teor de amido, Dougal et al. (2014) observaram que a dieta rica em fibra apresentou predominância do filo Firmucutes e houve aumento de Proteobacterias nas dietas de óleo e amido. Quando analisaram ao nível de família, encontraram comunidade bacteriana central em todos os cavalos, nas três dietas, composta principalmente por *Lachnospiraceae* (responsável pela produção do butirato). Na dieta feno, detectaram *Porphyromonadaceae*, *Fibrobacteraceae*, *Clostridia* não classificados e *Prevotellaceae* (bactérias celulolíticas e fibrolíticas); na dieta de amido, *Lachnospiraceae* foi predominante e a composição microbiana na dieta de óleo foi semelhante a encontrada na dieta de feno. Dietas baseadas em forragem acrescidas de concentrado foram associadas a diferenças na composição e diversidade bacteriana fecal em comparação com uma forragem sozinha.

Muhonen, Sadet-Bourgeteau e Jullian (2021) avaliando a composição microbiana no ceco, cólon e fezes em cavalos que receberam dietas à base de forragem diferindo na composição de fibra e maturidade. Observaram que independente da maturidade e do tipo da forragem não houve diferença na composição da microbiota, tendo como maior concentração as bactérias celulolíticas (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus*). Ao adicionar concentrado, observaram alteração na microbiota, com aumento nas bactérias utilizadoras de lactato, xinalolítica e pectinolítica. Foi encontrado diferença na concentração das bactérias entre os locais de amostragem, sendo maior no ceco do que no cólon e fezes. Diferentes forragens e maturidades, não tiveram alteração na composição microbiana e, uma pequena adição de concentrado (amido de <1 g/kg PV) é o suficiente para causar o aumento de bactérias amilolíticas e produtoras de lactato. Independente da dieta, o ceco, cólon e fezes apresentam diferentes concentrações da microbiota.

Reed et al. (2021), avaliando a composição da microbiota no ceco, cólon dorsal direito, cólon ventral direito e fezes de equino a pasto e alimentados com feno, observaram diferenças na diversidade microbiana entre os compartimentos, onde o ceco e cólon ventral direito tiveram menor diversidade quando comparado com o cólon dorsal direito e as fezes. Sobre a composição da microbiota, foram encontrados em todos os compartimentos os filos Bacteroidetes, Firmicutes, Spirochaetes, Verrucomicrobia e Euryarchaeota, observando diferença na abundância de cada filo entre os compartimentos. O ceco e cólon ventral direito foram semelhantes, os filos de maiores abundâncias foram Bacteroidetes e Spirochaetes e no cólon dorsal direito e nas fezes,

também tiveram abundâncias semelhantes, sendo maiores, os filos Euryarchaeota e Verrucomicrobia. A microbiota fecal não é informativa do intestino grosso proximal (ceco e cólon ventral direito), mas pode fornecer informações sobre as comunidades dos compartimentos distais (cólon dorsal direito) (Costa et al., 2015).

## **2.5 Parâmetros bioquímicos da fermentação microbiana em diferentes dietas**

### **2.5.1 Ácidos graxos de cadeia curta**

Os AGCC, acetato, butirato e propionato, são os principais produtos oriundos da fermentação microbiana responsáveis por suprir até 70% da produção de energia do cavalo (SANTOS et al., 2011).

A absorção dos AGCC está vinculada ao sistema antiport ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) e a troca de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) associando as alterações no pH do intestino (ARGENZIO et al., 1977; HAMER et al., 2008; NEDJADI et al., 2014). Após a absorção, o acetato e o propionato chegam ao sistema porta-hepático. O propionato é absorvido pelo fígado e utilizado para síntese de glicose pela gliconeogênese, e o acetato entra na circulação podendo fornecer carbono para a síntese de lipídio, como também é um precursor metabólico de Acetil-COA, este é o único ácido graxo que atinge os tecidos periféricos e utilizado de forma direta como energia (BRANDI; FURTADO, 2009; MATOS et al., 2017; SHEPHERD et al., 2014). O butirato é absorvido pelos colonócitos, fornecendo energia e possuindo importante papel sobre a saúde intestinal, tendo como função a regulação e manutenção do epitélio (PRYDE et al., 2002; NIELSEN et al., 2018).

Para melhor compreensão das taxas de absorção dos AGCC e do efeito das dietas, é necessário a mensuração da concentração dos AGCC na veia porta em conjunto com as concentrações no ceco, fezes e sangue (SHEPHERD et al., 2014). Warzecha et al. (2017) avaliando a inclusão abrupta de uma dieta com alto amido, observaram aumento na concentração do propionato e butirato e redução do acetato no ceco, ao comparar com uma dieta com baixo amido. Dados semelhantes foram obtidos por Kristoffersen et al. (2016) que testaram dieta rica em fibra e dieta rica em amido, e observaram, após a adaptação as dietas, aumento da produção do propionato e butirato e redução do acetato no ceco na dieta rica em amido.

Raspa et al. (2022) avaliando o efeito de dieta rica em amido e dieta rica em fibra sobre diferentes compartimentos do intestino, observaram que a dieta rica em fibra apresentou

maiores concentrações de ácidos graxos totais (principalmente do acetato e butirato) nos compartimentos no ceco e flexura externa, enquanto a dieta rica em amido apresentou maiores concentrações na flexura pélvica, colón dorsal direito e reto/fezes. Dados semelhantes foram encontrados por Ochonski et al. (2021), que encontraram maior concentração de AGCC no ceco quando os cavalos foram alimentados com dieta alta fibra comparado a dieta alto amido.

Avaliando-se a concentração dos AGCC no sangue e ceco de equinos que recebiam dietas, a base de fibra e a base de amido, e depois adicionando melaço nas duas dietas, Jensen et al. (2016) observaram a maior produção de AGCC no ceco para a dieta a base de amido e no sangue a maior produção foi na dieta a base de fibra. As dietas a base de fibra apresentaram maior concentração de acetato no ceco e no sangue.

Brokner et al. (2016) avaliando a concentração dos AGCC no ceco, sangue e fezes de equinos que receberam dietas com fibras de diferentes composições, observaram que no ceco e nas fezes houve aumento da concentração dos AGCC, principalmente do propionato quando aumentaram o amido da dieta. No sangue, foram encontradas concentrações de acetato, butirato e propionato, sendo que a concentração de acetato foi maior que dos outros ácidos graxos na dieta exclusiva de feno comparada com a dieta que teve inclusão de grãos.

Shepherd et al. (2014), avaliando as concentrações de AGCC no sangue e nas fezes em equinos mantidos a pasto e recebendo feno, observaram que houve a maior concentração de acetato nas fezes. As fezes apresentaram maior concentração de acetato do que no sangue.

### 2.5.2 pH e a capacidade tamponante (CT)

A mensuração do pH é um método não invasivo para quantificação indireta da acidose no intestino grosso, sendo uma metodologia utilizada para avaliar a saúde do trato gastrointestinal do equino (RICHARDS; HINCH; ROWE, 2006). Em conjunto com o pH, a capacidade tamponante (CT) é um parâmetro importante na avaliação de distúrbios digestivos (SANTOS et al., 2009).

Segundo Zeyner, Geissler e Dittrich (2004), o pH observado e o valor da CT representa o potencial real do organismo em reagir contra modificações influenciadas pela produção de ácidos. Os principais sistemas-tampão que operam no intestino grosso de equinos e que podem influenciar o pH são os tampões bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). O  $\text{HCO}_3^-$  é secretado no duodeno pelo pâncreas, no íleo e em menor quantidade



no intestino grosso e o fosfato é oriundo do metabolismo da dieta, podendo influenciar na neutralização do conteúdo intestinal.

Ochonski et al. (2019) observaram diminuição do pH cecal quando equinos foram alimentados com dieta alto amido, o que pode levar a caso de disbiose, e prejudicar a atividade fermentativa microbiana. Ochonski et al. (2021) testando feno, aveia, milho, farelo de trigo, casca de soja, alfafa desidratada e polpa de beterraba, como ingredientes compostos em concentrado, observaram que as dietas com concentrados, independente do ingrediente adicionado, o pH cecal foi semelhante a dieta somente de feno (6,81-7,37).

Muhonen, Sadet-Bourgeteau e Julliand (2021) observaram que a dieta que continha carboidratos mais facilmente digeríveis apresentaram maior pH no ceco e colón, e menor pH nas fezes. A CT foi maior no ceco do que no colón independente da dieta, propondo que a CT diminui ao longo do trato gastrointestinal, o que leva o menor pH nas fezes do que no ceco e colón. Santos et al. (2009) observaram que houve redução na CT á pH6 e pH5, o que significa que com a sobrecarga do amido, o organismo dos equinos não foi capaz de manter o pH fecal acima de 5 e 6, sugerindo o desenvolvimento de uma acidose clínica.

Kabe et al. (2016) avaliando a inclusão de até 28% casca de soja no concentrado observaram que não houve efeito da inclusão sobre a produção dos AGCC, pH fecal e CT. Menezes et al., (2014) testou a inclusão de até 28% de polpa cítrica no concentrado e não causou a redução da concentração de AGCC, mostrando que dietas com fibras de fácil fermentação são benéficas para atender a demanda energética sem causar risco a saúde do equino. Ingredientes fibrosos com alta disponibilidade de energia conhecidos por “superfibras”, como a casaca de soja, polpa de beterraba e polpa cítrica, são alternativas para aumentar a energia da dieta e reduzir o aporte de amido, onde aumentam a produção de AGCC, sem afetar o pH e a saúde dos equinos (BRANDI; FURTADO, 2009).

Correa et al., (2016) avaliaram a inclusão de até 30% de farelo de glúten de milho 21 (CGM 21, ingrediente rico em proteína e fibra) no concentrado e observaram o nível de inclusão do ingrediente não causou redução do pH, CT e concentração dos AGCC nas fezes. Reforçando que ingredientes ricos em proteína e fibra podem ser utilizados para reduzir a utilização do amido (RASPA et al., 2022; JANSSON AND LINDBERG., 2012 e MUHONEN et al., 2021).

### **3 OBJETIVO**

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de dietas com diferentes fontes energética sobre a digestibilidade aparente, metabolismo de AGCC e microbiota cecal e fecal de equinos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito de dietas a base de feno, fibra e óleo, e amido e açúcar sobre a digestibilidade aparente da dieta;
- Avaliar o efeito de dietas a base de feno, fibra e óleo, e amido e açúcar sobre a composição, diversidade e abundancia da microbiota (bactéria, archaea e protozoários) no ceco e nas fezes de equinos;
- Avaliar o efeito de dietas a base de feno, fibra e óleo, e amido e açúcar sobre o metabolismo de AGCC no ceco, fezes e sangue de equinos;
- Avaliar o efeito de dietas a base de feno, fibra e óleo, e amido e açúcar sobre o pH e a CT a pH 5 e pH6 no liquido cecal e nas fezes de equinos.
- Avaliar se as fezes podem ser utilizadas como representativas da microbiota cecal em equinos hígidos.

#### 4      **CAPITULO 1**

### **Fibra e óleo vs açúcar e amido: efeito na digestibilidade, microbiota e perfil de ácidos graxos de cadeia curta em equinos**

L.A. Brandi<sup>a</sup>, N.T. Schmidt<sup>a</sup>, J.C.C. Balieiro<sup>b</sup>, R.A. Brandi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo 13635-900, Brazil

<sup>b</sup> Department of Animal Nutrition and Production, School of Veterinary Medicine and Animal Science FMVZ, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo 13635-900, Brazil

## Resumo

Este estudo foi realizado para analisar a viabilidade da utilização de dietas a base de fibra e óleo em detrimento a dietas a base de açúcar e amido, utilizando como parâmetros a digestibilidade aparente, microbiota, perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e alterações de meio ambiente no ceco e nas fezes de equinos. Utilizou-se cinco cavalos hípidos, com peso vivo de  $384 \pm 9,51$  kg. As dietas experimentais foram: Feno (exclusivamente feno de Tifton 85), Dieta AA (amido e açúcar), e Dieta FO (fibra e óleo), mantendo a relação volumoso:concentrado 70:30. Amostras fecais foram coletadas para análise da digestibilidade aparente (com marcador externo), concentração de AGCC (cromatografia gasosa), pH e capacidade tamponante (CT) e perfil da microbiota (sequenciamento 16S rRNA). A exceção da digestibilidade, as demais variáveis também foram analisadas no líquido cecal. No sangue foi determinada a concentração de AGCC. O experimento seguiu o desenho experimental Cross Over. As dietas com adição de concentrado diminuíram a digestibilidade de MS, FDN e FDA ( $p < 0,05$ ). Não foi observado efeito ( $p > 0,05$ ) das dietas sobre a concentração de AGCC (acetato, butirato e propionato) no ceco e nas fezes. A inclusão de concentrados, reduziu o pH fecal e aumentou a CT cecal e fecal ( $p < 0,05$ ). A dieta FO apresentou menor CT. A dieta FO comparada com a dieta AA apresentou maior abundância de bactérias fibrolíticas (*Ruminococcaceae* e *Prevotellaceae UCG-004*) e bactérias associadas à produção de butirato (*Rikenellaceae*, *Anaerovibrio* e *Akkermansia*). A utilização de dietas a base de fibra e óleo são uma alternativa viável e segura para a nutrição de equinos. Apresentam digestibilidade aparente semelhante a dieta açúcar e amido, favorecem a diversidade da microbiota e a mantém com maior abundância de bactérias fibrolíticas, mantém o pH e CT dentro de valores fisiológicos e estimulam a produção de AGCC.

**Palavras chaves:** Cavalo, Concentrado, Fibra, intestino grosso, óleo, pH.

**Highlights**

- Dieta a base de fibra e óleo (FO) são uma alternativa segura para a nutrição de equinos;
- Dieta FO favorece a produção de ácidos graxos de cadeia curta;
- Dieta FO favorece a diversidade microbiana e a abundância de bactérias fibrolíticas;
- Dieta FO favorece a manutenção das condições do meio ambiente em condições saudáveis.

## 1.Introdução

Os cavalos são herbívoros que conseguem atender de 30 a 70% de suas necessidades diárias de energia a partir da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), oriunda da fermentação microbiana da fibra, (Muhonen et al., 2021; Ochonski et al., 2021), no entanto, dietas com excesso de concentrado são comumente utilizadas em equinos (Kristoffersen et al., 2016) e podem levar a distúrbios gastrointestinais, como cólicas (Costa and Weese, 2012) acidose e laminite (Al Jassim and Andrews, 2009; Hesta and Costa, 2021).

O excesso de amido escapa da digestão no intestino delgado e é fermentado no intestino grosso, podendo levar à diminuição da digestibilidade da fração fibrosa (Drogoul et al., 2001; Miraglia et al., 2006) por promover a diminuição do pH e por modificar o perfil de fermentação (Julliand et al., 2001). Por outro lado, dietas a base de fibra provocam menores alterações na produção de AGCC e no pH, apresentando menor risco à saúde dos equinos, sendo assim uma alternativa segura na nutrição de equinos (Muhonen et al., 2021; Ochonski et al., 2021, 2019).

Considerando os riscos que a alta inclusão de amido pode causar à saúde dos equinos, pesquisas na área de nutrição equina vêm recomendando a utilização de dietas a base de fibras em detrimento do amido (Braga et al., 2008; Harris et al., 2017). A utilização do óleo nas dietas também é uma alternativa que vem sendo usada para aumentar o aporte energético da dieta reduzindo os riscos à saúde do equino (Correa et al., 2016; Williams et al., 2017).

Para investigar o efeitos das dietas no intestino grosso, é comumente utilizado amostras fecais (Collinet et al., 2021; Harlow et al., 2016; Shepherd et al., 2014) que não refletem o que ocorre no ceco, mas podem ser usadas como representativo do colón dorsal direito (Costa et al., 2015), mas para melhor compreensão se faz necessária a realização de coletas em outros compartimentos do intestino além das fezes (Dougal et al., 2014; Shepherd et al., 2014).

Em estudo realizado por Grimm et al., (2020), observaram que quando cavalos passam de uma dieta 100% de feno para uma dieta com adição de concentrado, é observado diminuição das bactérias fibrolíticas e um aumento da bactéria amilolíticas tanto no ceco, como no cólon e fezes, porém a diversidade no ceco é menor que no cólon e fezes o que culminou na menor produção de AGCC no ceco e um aumento da produção nas fezes devido a maior diversidade. Resultados semelhantes foram encontrados por

Sorensen et al., (2021) que observaram maior pH e diversidade microbiana nas fezes do que no ceco e, maior concentração de AGCC no ceco do que nas fezes, quando os cavalos foram alimentados com feno de alfafa do que feno de bromegrass. Observando como os parâmetros de fermentação e a diversidade microbiana podem ser afetados pelo diferente tipo de fibra e pelo local de amostragem no intestino posterior.

Diante disso, este estudo foi realizado para analisar a viabilidade da utilização de dietas a base de fibra e óleo em detrimento a dietas a base de açúcar e amido, utilizando como parâmetros a digestibilidade aparente, microbiota, perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e alterações de meio ambiente no ceco e nas fezes de equinos.

## **2. Materias e métodos**

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, sob protocolo número CEUA 2057/21.

A pesquisa foi realizada no setor de Equideocultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV UNESP, Campus de Jaboticabal/ SP.

### **2.1. Animais e manejo diário**

Foram utilizados cinco equinos hípidos, sem raça definida, machos e fêmeas com idade média de  $10 \pm 2,6$  anos e peso vivo de  $384 \pm 9,51$  kg, submetidos a cirurgia de tifloplexia precedentemente ao projeto. No início e final de cada período de teste das dietas, os cavalos foram pesados em uma balança mecânica e foi realizada a classificação do escore corporal segundo metodologia de Henneke et al., (1983).

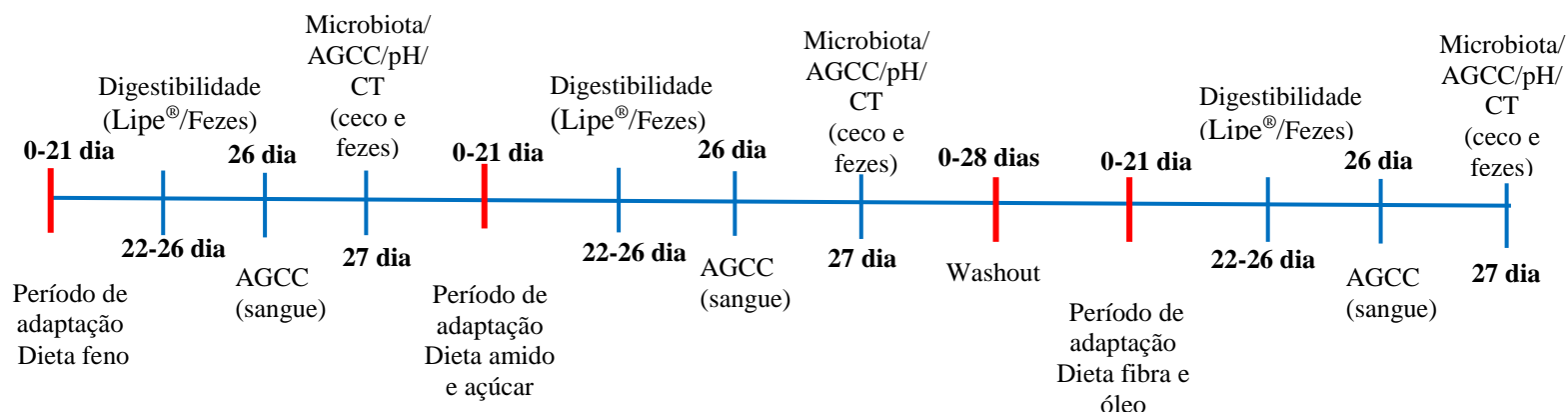
Os cavalos foram alojados em baias individuais de alvenaria com piso de cimento, contendo bebedouro automático e comedouro. Diariamente, os animais foram soltos em piquete de terra com acesso a água e, sem acesso ao pasto, por quatro horas, duas horas no período da manhã (11:00 a 13:00h) e duas horas no período da tarde (15:30 a 17:30h).

### **2.2. Desenho experimental**

Foi utilizado Delineamento Cross Over, sendo que os animais receberam inicialmente a dieta feno, posteriormente dieta amido e açúcar (AA) e da dieta fibra e óleo

(FO). O período de adaptação as dietas foram de 21 dias, seguido de cinco dias de coleta de amostras fecais para a determinação da digestibilidade aparente. No quinto dia foi realizada a coleta de amostra de sangue para a determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) antes do primeiro arraçoamento. No sexto dia, foi realizada a coleta do líquido cecal e fezes para a determinação da microbiota, AGCC, pH e capacidade tamponante (CT) a pH6 (CT6) e pH5 (CT5), também antes do arraçoamento (Imagem 1).

Entre as dietas houve um período de intervalo de 28 dias (*washout*) em que os cavalos foram soltos no pasto durante o dia e, à noite permaneciam nas baias. A alimentação foi feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) a vontade e sal mineralizado durante todo o período (Imagem 1).



**Imagem 1.** Esquematização do período experimental com a apresentação da sequência das dietas, tempo de adaptação, coleta amostral das variáveis (digestibilidade aparente, AGCC, pH, CT e microbiota) e período de descanso (*washout*) (Fonte: própria autoria).

### 2.3. Dietas experimentais

As dietas foram calculadas para atender à exigência nutricional de cavalos em manutenção segundo preconizado pelo NRC (National Research Council, 2007) mantendo níveis de proteína e energia os mais próximos possíveis, atendendo a quantidade mínima de FDN (30% da dieta) preconizada por Braga et al., (2008) e não ultrapassando a inclusão máxima de amido (1,1g de amido/kg de PV/ refeição) preconizada por Vervuert et al., (2009).



Na primeira parte da tabela 1 estão descritas as composições dos ingredientes utilizados nas dietas e na segunda a composição da dieta utilizada respeitando-se a proporção de ingestão de 70% de volumoso e 30% de concentrado, em base de matéria seca e de 56:44 em base de energia digestível. O Feno de Tifton 85-1, foi utilizado na dieta Feno e AA o Feno de Tifton 85-2, foi utilizado na dieta FO.

**Tabela 1.** Composição químicas dos ingredientes e dos nutrientes das dietas, feno (F), amido e açúcar (AA) e fibra e óleo (FO)

Nutrientes dos ingredientes das dietas (%)	Feno Tifton 85	Concentrado amido e açúcar	Feno Tifton 85	Concentrado alta fibra	Farelo de soja	Óleo de soja
Matéria Seca	93,59	89,25	94,73	87,0	89,24	100
Matéria Mineral	8,36	11,58	5,79	12,54	6,91	
Proteína Bruta	12,86	16,45	8,43	13,38	48,39	
Extrato Etéreo	1,42	5,78	1,33	3,92	1,02	92
Fibra em detergente neutro	74,04	26,51	77,14	37,88	22,35	
Fibra em detergente ácido	39,80	10,69	41,93	23,49	13,66	
Fibra Bruta	36,94	8,46	40,23	18,0	6,86	
Hemicelulose	34,24	15,82	35,21	14,39	8,69	
Amido	0,1	22,2	0,1	16,09	0,62	
Energia Digestível (Mcal/kg)*	1,62	2,6	1,60	2,1	3,41	8,3
Energia Bruta (cal/g)	4160	3740	4220	3820	4676	
Composição química das dietas (relação volumoso: concentrado 70:30, em base de MS)						
Nutrientes das dietas (%)	F	AA	FO			
Matéria Seca	93,59	92,28	93,22			
Matéria Mineral	8,36	9,32	6,61			
Proteína Bruta	12,86	13,93	13,66			
Extrato Etéreo	1,42	2,72	5,36			
Fibra em detergente neutro	74,04	59,78	61,91			
Fibra em detergente ácido	39,8	31,06	34,23			
Fibra Bruta	36,94	28,39	31,46			
Hemicelulose	34,24	28,71	27,68			
Amido	0,1	5,32	1,70			
Energia Digestível estimada (Mcal/kg)*	1,62	1,91	2,16			
Energia Bruta (cal/g)	4160	4034	4048,74			

\* ED estimada (ração)= 4,07- 0,55\* (%FDA), e ED(feno)=2,118+(0,01218\*PB)-(0,0093\*FDA)-[0,00383\*(FDN-FDA)]+(0,04718\*EE)-(0,0262\*MM). NRC (2007).

O consumo de Matéria original e Matéria seca das dietas estão descritos na tabela 2. O consumo médio de matéria seca para a dieta Feno foi de 2,02%, para a dieta AA foi de 2,1% e para a dieta FO 2,23%, em base de matéria seca.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão das quantidades de Matéria original (MO) e Matéria seca (MS) dos ingredientes consumidos das dietas feno (F), amido e açúcar (AA) e fibra e óleo (FO).

Ingredientes das dietas	MO (kg) média e desvio padrão	MS (kg) média e desvio padrão
<b>Dieta F</b>		
Feno Tifton-85	9,4±1,51	8,4±1,36
<b>Dieta AA</b>		
Feno Tifton-85	6±0,00	5,38±0,15
Concentrado comercial amido e açúcar	2,92±0,07	2,6±0,07
<b>Dieta FO</b>		
Feno Tifton-85	4,62±2,59	4,28±2,39
Concentrado comercial alta fibra	1,2±0,00	1±0,00
Farelo de soja	1±0,00	0,9±0,00
Óleo de soja (ml)	300	

Os cavalos foram arraçoados na dieta Feno, as 08:00, as 14:00 e as 17:00h e nas dietas com adição de concentrado foi ofertado às 08:00 e às 14:30h, e o volumoso às 07:30, 14:00 e 17:00h, considerando que 2/3 do montante total do volumoso foi oferecido no período noturno. Os cavalos tiveram livre acesso a água e receberam diariamente 50g de sal mineralizado comercial.

## 2.4. Metodologia de coleta e análise

### 2.4.1. Digestibilidade aparente da dieta

A digestibilidade aparente da dieta foi estimada com utilização de marcador externo, a lignina purificada e enriquecida (Lipe<sup>®</sup>) (Lanzetta et al., 2009). Nos últimos cinco dias de cada período experimental foi oferecido, via oral, uma cápsula contendo 0,5g/animal/dia do Lipe<sup>®</sup> no arrojamento de manhã.

Foram coletadas 400g de fezes da primeira defecação do dia, armazenadas em sacos plásticos e congelados a -20°C. Ao término do experimento, as amostras foram descongeladas para a preparação de um pool das fezes, de cada animal, referente aos cinco dias de coleta. Com 400g do pool das amostras, foi realizada à pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. Em seguida, as amostras foram novamente pesadas e trituradas em moinho tipo Willey em peneira com crivo de 1 mm (Garcia et al., 2014).

Finalizada a trituração, as amostras foram acondicionadas em coletor universal de plástico estéril de 80mL, e enviados ao laboratório de nutrição da Escola de Veterinária da UFMG para estimativa da produção fecal (PF), pelo Lipe<sup>®</sup>, através de espectrômetro de infravermelho segundo Saliba (2005).

As análises bromatológicas das fezes e dos alimentos foram realizadas no laboratório multiusuário de nutrição animal e bromatologia da FMVZ USP, campus Fernando Costa. As variáveis analisadas foram matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB), energia bruta (EB) de acordo com Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 1995). O amido foi analisado com um método colorimétrico (Hendrix, 1993). A fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose, de acordo com Van Soest et al., (1991).

O cálculo da digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) e dos nutrientes (DAN) foi descrita por Pond et al. (1995) e Saliba (2005),

$$DMS(\%) = ((\text{Consumo de MS} - \text{PF}) / (\text{Consumo de MS})) * 100$$

Para os demais nutrientes foi utilizada a seguinte fórmula para calcular a digestibilidade aparente dos nutrientes (DAN):

$$DAN(\%) = ((\text{Consumo de MS} * \% \text{ do nutriente na dieta}) - (\text{PF} * \% \text{ do nutriente nas fezes})) / (\text{Consumo de MS} * \% \text{ do nutriente na dieta}) * 100$$

#### **2.4.2. Análises realizadas no líquido cecal e fezes**

Nas amostras do líquido cecal e fezes, foi realizada determinação da microbiota, concentração de AGCC, pH e CT a pH6 e a pH5. As amostras foram coletadas uma vez no dia, no período da manhã, antes do arraçoamento. Para a coleta das amostras do líquido cecal foi realizada a canulação no ceco dos animais seguindo metodologia adapta de Uribe Diaz et al., (2010) e as amostras fecais foram coletadas diretamente do reto, segundo Grimm et al., (2020)

##### **2.4.2.1. Determinação da microbiota no ceco e fezes**

A coleta das amostras, para a análise da microbiota, seguiu a metodologia adaptada de Kristoffersen et al., (2016), 10mL do líquido cecal e 10g das fezes foram

aliquotados em volumes de 5mL armazenados em criotubos de 5 mL e congelados a -80°C em nitrogênio líquido, para posteriormente serem descongeladas e analisadas no laboratório.

A determinação da microbiota cecal e fecal foi utilizada na metodologia adaptada de Paßlack et al., (2020). Foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA, da região V4, primers 16S-515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 16S-805R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), pelo sistema Illumina MiSeq usando o kit de reagente v2 (300 ciclos). A extração de DNA da microbiota foi realizada utilizando o kit comercial GenElute Stool DNA (SIGMA-Aldrich, Darmstadt, DE) seguindo as recomendações do fabricante. As leituras direta e reversa (ferramenta BBMerge; Bushnell et al., 2017) foram combinadas, de multiplexadas e analisadas utilizando o banco de dados SILVA versão 138.1 (Schloss et al., 2009; Yilmaz et al., 2014). Para a determinação da diversidade microbiana, foi analisada a diversidade utilizando-se o índice Shannon, e a para a análise de abundância relativa foi assumido um valor significativo de  $p \leq 0,01$ , utilizando o pacote DADA2 versão 1.24.0 (Paßlack et al., 2020; Schloss et al., 2009; Warzecha et al., 2017).

#### **2.4.2.2 AGGC nas fezes, líquido cecal e sangue**

Para a determinação da concentração dos AGCC no líquido cecal e nas fezes, foi utilizado a metodologia adaptada Warzecha et al., (2017). Foi colhido 10mL do líquido e armazenados em eppendorfs<sup>®</sup>, e para a análise nas fezes, 50ml (provenientes da mistura, pós filtragem de 50g de fezes a 100mL de água destilada) foram armazenados em tubo Falcon. Em seguida, ambas as amostras cecais e fecais foram congeladas a -20°C para posterior análise em laboratório.

As amostras sanguíneas foram coletadas da veia jugular, antes do primeiro arraçamento, utilizando-se tubos com heparina sódica. O preparo das amostras ocorreu segundo metodologia descrita por Hussein et al., (2004), e as concentrações de AGCC, acetato, propionato e butirato, foram mensurados no Laboratório de Fermentabilidade Ruminar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (Pirassununga, Brasil), através de cromatografia em fase gasosa (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão).

#### **2.4.2.3 Análise do pH e CT a pH 5 e pH6 no líquido cecal e nas fezes**

A determinação do pH foi realizada conforme a metodologia de Santos et al. (2009). Foram coletados 50mL de líquido cecal e 50g e com a introdução direta de um peagâmetro portátil nas amostras, o pH foi mensurado.

A capacidade tamponante (CT) a pH6 (CT6) e pH5 (CT5) foi mensurada segundo a metodologia adaptada de Zeyner et al., (2004). Para a CT no ceco, foi coletado 50ml de líquido cecal, filtrados em papel filtro de 15cm e obtido como solução final 50ml da amostra. Para a CT nas fezes, foram coletados 50g de fezes, adicionando 100 mL de água destilada, homogeneizando e filtrando em papel filtro 15cm, retirando-se 80 mL da solução das amostras fecais. Das soluções finais das amostras do líquido cecal e das fezes, foi realizada a titulação com ácido acético a 0,25M, anotando o volume de ácido utilizado quando o pH chegava a 6 e a 5. Para o cálculo da CT, aplicou-se a formula  $CT (mmol/L) = Volume (mL) * 3,125$ .

#### **2.4.5. Tamanho de partícula das fezes**

A determinação do tamanho de partículas das fezes foi realizada segundo metodologia adaptada de Grev et al., (2021), na qual 250 g de amostra fecal foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 105°C por 72 horas e em seguida colocadas em agitador automático de peneira. Foram utilizadas peneiras com malhas de aço inoxidável de 4mm, 2,8mm, 1mm e menor que 1mm, posicionadas umas sobre as outras, da maior para a menor. A amostra fecal foi colocada na peneira superior (4mm) e foi agitada a 300RPM por 10 min. Finalizado o processo de agitação, o material retido dentro de cada peneira foi pesado e convertido em porcentagem para análise de distribuição de tamanho de partícula.

#### **2.5. Análise estatística**

Para as análises da digestibilidade, tamanho de partícula nas fezes, e para AGCC, pH e CT a pH 5 e pH6 no líquido cecal e nas fezes de equinos, adotou-se um modelo misto, considerando o efeito fixo de Dieta além dos efeitos aleatórios de animal e o erro aleatório. Para as análises da microbiota, para cada microrganismo observado em determinado táxon, foi utilizado um modelo misto linear generalizado, assumindo que a

abundância de cada microrganismo segue distribuição binomial. O mesmo modelo foi utilizado para a análise da diversidade utilizados os índices de Shannon. O modelo linear misto geral contemplou o efeito fixo de dietas, além do efeito aleatório de animal. Diferentes estruturas de covariâncias foram avaliadas e selecionadas pela comparação do modelo, com base no critério de AIC proposto por Akaike, (1974).

Para todas as variáveis analisadas, em caso de efeitos significativos para a fonte de variação Dieta, adotou-se o Teste de Tukey como procedimento de comparação de médias ( $p < 0,05$ ). Para todas as análises estatísticas, utilizou-se como auxílio o procedimento PROC MIXED do programa SAS, versão 9.4 (SAS, 2002).

### 3. Resultados

#### 3.1. Escore corporal e Peso

Não foi observado efeito de dieta sobre o escore corporal e o peso ( $p > 0,01$ ) dos animais (Tabela 3, 4). Os cavalos apresentaram escores corporais de  $5,8 \pm 0,45$  classificados entre moderado e moderadamente gordo segundo metodologia de Henneke et al., (1983).

**Tabela 3.** Média e erro padrão do escore corporal e peso vivo (kg) de equinos alimentados com dieta Feno (F), dieta Amido e açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO).

Dieta	Escore corporal e erro padrão	Peso vivo (kg) e erro padrão
F	$5,8 \pm 0,21^A$	$386,80 \pm 4,74^A$
AA	$5,8 \pm 0,21^A$	$381 \pm 4,74^A$
FO	$5,75 \pm 0,23^A$	$384,94 \pm 4,85^A$

Utilizando-se o Teste de Tukey, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em cada coluna ( $p < 0,05$ ).

#### 3.2. Digestibilidade

Foi observado efeito de dieta sobre a digestibilidade aparente da MS, FDN, FDA, amido, Hem, PB, EE e EB ( $p < 0,05$ ). A dieta feno apresentou maior digestibilidade aparente MS, FDN, FDA, EB ( $p < 0,05$ ). A dieta AA apresentou a maior digestibilidade aparente do amido e HEM, enquanto a dieta FO apresentou a maior digestibilidade aparente da PB e EE ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Média e erro padrão do efeito de dieta feno (F), amido e açúcar (AA) e fibra e óleo (FO) sobre a digestibilidade aparente da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), amido, extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) e energia bruta (EB).

Digestibilidade aparente dos nutrientes (%)	Dietas		
	F	AA	FO
MS	63,81±1,90 <sup>A</sup>	51,16±1,90 <sup>B</sup>	55,28±2,13 <sup>B</sup>
PB	72,56±1,79 <sup>A</sup>	66,15±1,79 <sup>B</sup>	74,61±2,00 <sup>A</sup>
FDN	62,65±1,82 <sup>A</sup>	43,43±1,82 <sup>B</sup>	48,51±2,03 <sup>B</sup>
FDA	46,03±1,35 <sup>A</sup>	19,31±1,35 <sup>C</sup>	25,88±1,51 <sup>B</sup>
HEM	16,62±1,00 <sup>B</sup>	24,12±1,00 <sup>A</sup>	22,35±1,10 <sup>A</sup>
Amido	32,52±5,71 <sup>B</sup>	97,82±5,72 <sup>A</sup>	95,49±6,40 <sup>A</sup>
EE	60,61±3,45 <sup>B</sup>	57,35±3,45 <sup>B</sup>	78,75±3,76 <sup>A</sup>
EB	61,68±1,77 <sup>A</sup>	49,97±1,77 <sup>B</sup>	56,96±1,98 <sup>A</sup>

Utilizando-se o Teste de Tukey, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em cada linha ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Determinação da microbiota no ceco e fezes

No ceco e nas fezes foi observado efeito de dieta sobre a microbiota (nível de gênero) ( $p < 0,05$ ). A dieta Feno apresentou maior abundância relativa de bactérias fibrolíticas e celulolíticas (Tabela 5). A dieta FO apresentou maior abundância relativa de bactérias fibrolíticas produtoras de butirato (*Akkermansia* e *Anaerovibrio*) quando comparado com a dieta AA (Tabela 5).

**Tabela 5.** Média e erro padrão do efeito de dieta sobre os principais gêneros de bactérias com abundância relativa (>1%), no ceco e fezes, em cavalos alimentados com dieta Feno (F), dieta Amido e Açúcar (AA) e deita Fibra e óleo (FO).

Gêneros/Local amostral	Dietas			
	Ceco	F	AA	FO
Treponema		4,63±1,07 <sup>B</sup>	6,09±1,39 <sup>A</sup>	1,88±0,45 <sup>C</sup>
Fibrobacter		2,88±0,70 <sup>A</sup>	2,73±0,67 <sup>A</sup>	1,61±0,40 <sup>B</sup>
Rikenellaceae RC9 gut group		2,27±0,32 <sup>A</sup>	2,50±0,35 <sup>A</sup>	1,42±0,20 <sup>B</sup>
Anaerovibrio		1,13±0,27 <sup>B</sup>	1,16±0,28 <sup>B</sup>	1,94±0,46 <sup>A</sup>
Akkermansia		0,77±1,16 <sup>C</sup>	0,90±1,34 <sup>B</sup>	1,65±2,46 <sup>A</sup>
Fezes	F	AA	FO	
Treponema	17,76±1,04 <sup>A</sup>	9,96±0,64 <sup>C</sup>	11,25±0,71 <sup>B</sup>	
Rikenellaceae RC9 gut group	9,36±0,85 <sup>C</sup>	11,64±1,04 <sup>B</sup>	15,09±1,29 <sup>A</sup>	
Fibrobacter	7,74±0,87 <sup>A</sup>	5,25±0,60 <sup>B</sup>	3,63±0,42 <sup>C</sup>	
Ruminococcus	1,70±0,17 <sup>C</sup>	2,11±0,22 <sup>B</sup>	3,33±0,34 <sup>A</sup>	
Streptococcus	0,01±0,00 <sup>C</sup>	3,41±1,19 <sup>A</sup>	0,16±0,06 <sup>B</sup>	
Prevotellaceae UCG-001	1,04±0,12 <sup>B</sup>	1,22±0,14 <sup>A</sup>	0,94±0,11 <sup>B</sup>	
Akkermansia	0,42±0,08 <sup>C</sup>	0,98±0,20 <sup>B</sup>	1,60±0,32 <sup>A</sup>	

Utilizando-se o Teste de Tukey, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em cada linha ( $p < 0,05$ ).

Não foi observado efeito de dieta sobre a diversidade microbiana (índice de Shannon) no ceco ( $p > 0,05$ ), mas foi observado efeito significativo nas fezes. A dieta AA ( $3,58 \pm 0,03$ ) e FO ( $3,48 \pm 0,04$ ) apresentaram maior diversidade do que a dieta Feno ( $3,40 \pm 0,03$ ) ( $p < 0,05$ )

### 3.4. Concentração dos AGCC no ceco, fezes e sangue

Não houve efeito de dieta sobre a concentração dos AGCC totais, acetato, butirato e propionato), relação (acetato:butirato)/propionato no ceco e nas fezes ( $p > 0,05$ ). A dieta Feno concentrações de acetato, propionato e butirato mais próximas as encontradas na dieta AA e superiores às observadas para a dieta FO, no ceco. Já nas fezes, observou-se maiores concentrações de acetato, propionato e butirato nas dietas AA e FO, em detrimento a dieta Feno.

Nas amostras sanguíneas, a dieta Feno apresentou maior concentração ( $p < 0,05$ ) de acetato, da relação (acetato:butirato)/propionato e foi a única dieta a apresentar



butirato. Não houve efeito de dieta sobre a concentração dos AGCC totais (propionato e butirato) ( $p>0,05$ ) (Tabela 6)

**Tabela 6.** Média e erro padrão do efeito de dieta, feno (F), amido e açúcar (AA) e fibra e óleo (FO), sobre a concentração de acetato, propionato, butirato AGCC Totais, e relação (acetato:butirato)/propionato (mmol/l) no ceco, fezes e sangue de equinos.

AGCC_Ceco (mmol/l)	Diets		
	F	AA	FO
Acetato	27,62±2,69 <sup>A</sup>	28,56±3,11 <sup>A</sup>	21,25±3,81 <sup>A</sup>
Propionato	9,81±0,59 <sup>A</sup>	10,05±0,68 <sup>A</sup>	7,37±0,84 <sup>A</sup>
Butirato	2,69±0,25 <sup>A</sup>	2,63±0,28 <sup>A</sup>	1,65±0,33 <sup>A</sup>
AGCC Totais	40,62±3,53 <sup>A</sup>	42,48±4,07 <sup>A</sup>	30,83±4,99 <sup>A</sup>
(acetato:butirato)/propionato	3,05±0,13 <sup>A</sup>	3,11±0,15 <sup>A</sup>	3,10±0,18 <sup>A</sup>
AGCC_Fezes (mmol/l)			
Acetato	6,62±0,89 <sup>A</sup>	7,87±0,89 <sup>A</sup>	7,32±0,97 <sup>A</sup>
Propionato	2,75±0,29 <sup>A</sup>	3,26±0,29 <sup>A</sup>	3,14±0,32 <sup>A</sup>
Butirato	0,56±0,10 <sup>A</sup>	0,70±0,10 <sup>A</sup>	0,62±0,11 <sup>A</sup>
AGCC Totais	10,33±1,34 <sup>A</sup>	12,32±1,34 <sup>A</sup>	11,43±1,46 <sup>A</sup>
(acetato:butirato)/propionato	2,61±0,11 <sup>A</sup>	2,57±0,11 <sup>A</sup>	2,49±0,12 <sup>A</sup>
AGCC_Sangue (mmol/l)			
Acetato	4,79±0,51 <sup>A</sup>	2,53±0,51 <sup>B</sup>	2,65±0,58 <sup>B</sup>
Propionato	0,38±0,10 <sup>A</sup>	0,41±0,08 <sup>A</sup>	0,55±0,09 <sup>A</sup>
Butirato	0,13±0,07		
AGCC Totais	5,14±0,64 <sup>A</sup>	2,94±0,64 <sup>A</sup>	3,21±0,72 <sup>A</sup>
(acetato:butirato)/propionato	21,69±4,16 <sup>A</sup>	6,16±3,22 <sup>B</sup>	5,08±3,60 <sup>B</sup>

Utilizando-se o Teste de Tukey, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em cada linha ( $p<0,05$ ).

### 3.5. pH e CT no ceco e fezes

Não houve efeito de dieta sobre o pH cecal ( $p>0,05$ ), porém houve efeito ( $p<0,05$ ) sobre o pH fecal, com os maiores valores para a dieta Feno (Tabela 7).

Para a CT, no ceco, não houve efeito de dieta sobre a CT5 ( $p>0,05$ ) porém houve efeito sobre a CT6 ( $p<0,05$ ). A dieta, FO, apresentou maior CT6 no ceco ( $p<0,05$ ).

Nas fezes, houve efeito de dieta sobre a CT5 e CT6 ( $p<0,05$ ). A dieta AA, apresentou maior CT5 e a dieta feno apresentou maior CT6 ( $p<0,05$ ).

**Tabela 7.** Média e erro padrão do efeito de dieta, feno (F), amido e açúcar (AA) e fibra e óleo (FO), sobre pH e a capacidade tamponante (CT) no ceco e fezes de equinos.

pH	Dietas		
	F	AA	FO
Ceco	7,18±0,10 <sup>A</sup>	7,45±0,11 <sup>A</sup>	7,60±0,14 <sup>A</sup>
Fezes	6,70±0,10 <sup>A</sup>	6,22±0,10 <sup>B</sup>	6,14±0,11 <sup>B</sup>
<b>CT5 (mmol/l)</b>			
Ceco	68,04±5,04 <sup>A</sup>	70,93±5,49 <sup>A</sup>	66,89±6,19 <sup>A</sup>
Fezes	19,81±1,80 <sup>B</sup>	25,99±1,80 <sup>A</sup>	17,65±1,97 <sup>B</sup>
<b>CT6 (mmol/l)</b>			
Ceco	29,37±2,48 <sup>B</sup>	36,94±2,67 <sup>A</sup>	41,87±2,96 <sup>A</sup>
Fezes	6,93±0,76 <sup>A</sup>	5,37±0,76 <sup>AB</sup>	3,66±0,85 <sup>B</sup>

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em cada linha ( $p > 0,05$ ).

### 3.6. Tamanho de partícula das fezes

Não foi observado efeito de dieta sobre o tamanho de partícula nas peneiras de 4mm e 2,8 mm das fezes ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8). Houve efeito de dieta ( $p < 0,05$ ) sobre as partículas de tamanho 1mm e menor que 1mm. A dieta feno apresentou maior retenção de partículas de 1mm e, a dieta FO apresentou a maior retenção de partículas menores que 1mm.

**Tabela 8.** Média e erro padrão do efeito de dieta, feno (F), amido e açúcar (AA) e fibra e óleo (FO), sobre a retenção do tamanho de partículas das fezes de equinos em peneiras com malhas de 4mm, 2,8mm, 1mm e menor que 1mm.

Retenção de partículas (%)	Dietas		
	F	AA	FO
Peneira 4 mm	0,88±0,22 <sup>A</sup>	0,68±0,22 <sup>A</sup>	0,98±0,24 <sup>A</sup>
Peneira 2,8mm	2,68±0,43 <sup>A</sup>	2,44±0,43 <sup>A</sup>	2,16±0,46 <sup>A</sup>
Peneira 1mm	47,38±1,71 <sup>A</sup>	38,46±1,71 <sup>B</sup>	32,37±1,91 <sup>C</sup>
Peneira menor que 1mm	49,04±1,97 <sup>C</sup>	58,41±1,97 <sup>B</sup>	64,37±2,15 <sup>A</sup>

Utilizando-se o Teste de Tukey, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, em cada linha ( $p > 0,05$ ).

## 4. Discussão

Diferente do idealizado, o experimento contou com duas partidas de feno distintas, sendo a primeira, de melhor qualidade, que foi utilizada no teste das dietas F e na dieta AA.

A qualidade deste feno, permitiu que mesmo sendo ingrediente único, a exigência nutricional de cavalos em manutenção fosse atendida, conforme descrito anteriormente por Jansson and Lindberg, (2012) e Muhonen et al., (2021), além de apresentar maior digestibilidade aparente da MS, FDN, FDA.

Para o teste do concentrado AA, utilizou-se uma dieta com predominância de feno (70%) e observou-se uma queda na digestibilidade da MS, FDN, FDA e EB, quando comparado com a dieta feno, como já observado por Miraglia et al., (2006), utilizando a relação de 75% de volumoso para 25% de concentrado. O efeito prejudicial de dietas a base de AA também foi referido por Muhonen et al., (2021).

Para a dieta FO, o feno utilizado foi de inferior qualidade (Tabela 1). À semelhança do ocorrido na dieta AA, houve uma diminuição nos coeficientes de digestibilidade, da MS, FDA, e FDN, quando comparado com a dieta F ( $p < 0,05$ ). Entre as dietas AA e FO, os coeficientes foram superiores para a dieta FO, em cerca de 5% nas variáveis informadas, resultado relevante, mesmo que não significativo estatisticamente. Este resultado por estar relacionado com a composição da dieta e da microbiota das fezes.

Na dieta F e FO, houve predomínio das bactérias fibrolíticas, o que pode justificar a maior digestibilidade da fração fibra na dieta FO, quando comparado com a dieta AA.

Na dieta AA, a quantidade de amido oferecido por refeição foi de 288,6g/refeição, enquanto que na dieta FO, foi de 158,76g/refeição. Para ambas as dietas, o aporte de amido está dentro do preconizado por Vervuert et al., (2009) e a digestibilidade foi alta (maior que 95%), e mesmo assim a dieta AA apresentou alteração na composição da microbiota, com a presença de *Streptococcus* (dado ainda não publicado), e no perfil fermentativo Grimm et al., (2020) com maiores valores de CT a pH5 e pH6, indicando maior esforço para neutralizando o pH intestinal e prevenindo a acidificação do compartimento (Baumhak et al., 2021; Santos et al., 2009) reforçando o efeito negativo desta dieta.

As dietas com adição de concentrado (AA e FO), apresentaram maiores valores de pH no ceco e menores nas fezes, assim como maiores CT5 e CT6. A diferença está

relacionada a maior absorção dos AGCC no ceco, que ocorre por processo ativo, sistema antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , e troca do  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , levando maior CT e regulação do pH no ceco quando comparada as fezes (Frape, 2008; Santos et al., 2009; Zeyner et al., 2004). Neste compartimento, também não se observou efeito da dieta ( $p>0,05$ ) sobre a concentração de AGCC (Tabela 6), mas um resultado ressalta aos olhos, que é a menor concentração na dieta FO, que pode estar ligada ao tipo de partículas presentes na dieta, inferiores a 1mm, com passagem mais rápida pelo ceco (Grev et al., 2021; Raspa et al., 2022).

O principal sítio de utilização das dietas com partículas menores, como as observadas nas dietas com concentrado, é o cólon e com isso as principais alterações são visualizadas nas fezes, uma vez que elas são mais representativas do compartimento (Costa et al., 2015).

Nas fezes, foi observado maior diversidade microbiana nas dietas com adição de concentrado e maior concentração de acetato, propionato e butirato, como previamente descrito por Grimm et al., (2017); Hansen et al., (2015) e Julliard et al., (2001). A maior concentração de butirato está relacionada com a maior abundância de bactérias como *Anaerovibrio*, *Akkermansia* e *Rikenellaceae RC9 gut group*, nas dieta AA e FO (dados ainda não publicados) que são conhecidas pela produção do butirato (Weinert-Nelson et al., 2022).

A maior proporção de acetato se deve a predominância de feno na dieta, que reflete na maior abundância de bactérias como, *Treponema*, *Fibrobacter*, e *Ruminococcaceae*, principalmente nas dietas FO e Feno, e na dieta AA foi encontrado a bactéria *Prevotellaceae* UCG-001, todas bactérias relacionada a degradação da parede celular vegetal (Grimm et al., 2020).

Ao analisarmos a dieta FO, observamos que a CT a pH6 e pH5 foi menor quando comparado com as outras dietas, o que pode estar ligada a sua composição, principalmente na disposição das fibras, pois esta dieta contém fibras de rápida e lenta fermentação, que são utilizadas em compartimentos diferentes do IG (Grev et al., 2021; Raspa et al., 2022).

Mesmo a dieta AA e FO tendo apresentado a maior concentração de AGCC nas fezes, concordando com Brokner et al., (2016); Grimm et al., (2017); Raspa et al., (2022); Sadet-Bourgeteau et al., (2017), quem apresentou a maior concentração sanguínea do

acetato no sangue foi a dieta F, corroborando com Jensen et al., (2016). O metabolismo de AGCC em equinos ainda é um enigma e precisa ser melhor estudado, mas acredita-se que esta situação se deva ao destino metabólico dos AGCC produzidos ao longo do IG, sendo o acetato, destinado a produção de energia e oxidação nos músculos e o propionato a gliconeogênese, ficando retido no fígado e o butirato é utilizado com fonte de energia pelos conócitos (Frape, 2008). Para melhor elucidação das taxas de absorção dos AGCC seria necessário a mensuração da concentração dos AGCC na veia porta em conjunto com as concentrações no ceco, fezes e sangue (Shepherd et al., 2014).

## 5. Conclusão

A utilização de dietas a base de fibra e óleo são uma alternativa viável e segura para a nutrição de equinos. Apresentam digestibilidade aparente semelhante a dieta açúcar e amido, favorecem a diversidade da microbiota e a mantém com maior abundância de bactérias fibrolíticas, mantém o pH e CT dentro de valores fisiológicos e estimulam a produção de AGCC.

## CRediT declaração de contribuição de autoria

**Laura Alves Brandi:** Conceituação, Metodologia, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Administração do projeto, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Roberta Ariboni Brandi:** Conceituação, Metodologia, Administração do projeto, Investigação, Supervisão, Validação, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Júlio César de Carvalho Balieiro:** Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados, Software. **Natalia Telles Schmidt:** Metodologia, Investigação.

## Conflito de interesses

Nenhum

## Declaração de Interesse Concorrente

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar

## Financiamento

Este estudo foi financiado pela FAPESP, bolsa 2020/12753-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, especialmente ao Prof. Dr. Paulo Canola e sua equipe de veterinários pela assistência no manejo dos cavalos durante este programa. Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

### Referencias

- Akaike, H., 1974. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19, 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Al Jassim, R.A.M., Andrews, F.M., 2009. The Bacterial Community of the Horse Gastrointestinal Tract and Its Relation to Fermentative Acidosis, Laminitis, Colic, and Stomach Ulcers. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 25, 199–215. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2009.04.005>
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. Official methods of analysis. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1025p.1995.
- Baumhak, M.J., dos Santos Michima, L.E., Andrioli, B.M., Brandi, R.A., Weigel, R.A., Nichi, M., Belli, C.B., de Siqueira, R.F., 2021. Buffering capacity and fecal pH in healthy horses submitted to experimental enteral nutrition. *Semin. Agrar.* 42, 3793–3802. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6Supl2p3793>
- Braga, A.C., Araújo, K.V., Leite, G.G., Mascarenhas, A.G., 2008. Neutral detergent fiber levels in diet of equines. *Rev. Bras. Zootec.* 37, 1965–1972. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001100010>
- Brokner, C., Austbo, D., Næsset, J.A., Blache, D., Bach Knudsen, K.E., Tauson, A.H., 2016. Metabolic response to dietary fibre composition in horses. *Animal* 10, 1155–1163. <https://doi.org/10.1017/S1751731115003006>
- Bushnell, B., Rood, J., Singer, E., 2017. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
- Collinet, A., Grimm, P., Julliand, S., Julliand, V., 2021. Sequential modulation of the equine fecal microbiota and fibrolytic capacity following two consecutive abrupt dietary changes and bacterial supplementation. *Animals* 11, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ani11051278>
- Correa, G.F., Nascimento, O.C.A., Mota, T.P., Hespanholo, G.O., Moreira, C.G.,

- Menezes, M.L., Vervuert, I., Balieiro, J.C.C., Bueno, I.C.S., Brandi, R.A., 2016. Impact on digestibility, and blood and fecal parameters of replacing wheat bran with corn gluten meal in concentrate of adult horses. *Livest. Sci.* 186, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.06.001>
- Costa, M.C., Silva, G., Ramos, R. V., Staempfli, H.R., Arroyo, L.G., Kim, P., Weese, J.S., 2015. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet. J.* 205, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.018>
- Costa, M.C., Weese, J.S., 2012. The equine intestinal microbiome. *Anim. Health Res. Rev.* 13, 121–128. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000035>
- Dougal, K., De La Fuente, G., Harris, P.A., Girdwood, S.E., Pinloche, E., Geor, R.J., Nielsen, B.D., Schott, H.C., Elzinga, S., Jamie Newbold, C., 2014. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087424>
- Drogoul, C., De Fombelle, A., Julliand, V., 2001. Feeding and microbial disorders in horses: 2: Effect of three hay:grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. *J. Equine Vet. Sci.* 21, 487–491. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(01\)70211-0](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(01)70211-0)
- Frape, D., 2008. *Equine Nutrition and Feeding*, 3rd ed. São Paulo.
- Garcia, T.R., De Rezende, A.S.C., Santiago, J.M., Terra, R.A., Fonseca, M.G., Da Costa, M.L.L., Lana, Â.M.Q., De Almeida, F.Q., 2014. Digestibilidade e consumo dos nutrientes em éguas Mangalarga Marchador suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* durante treinamento aeróbico. *Semin. Agrar.* 35, 2011–2018. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4p2011>
- Grev, A.M., Hathaway, M.R., Sheaffer, C.C., Wells, M.S., Reiter, A.S., Martinson, K.L., 2021. Apparent digestibility, fecal particle size, and mean retention time of reduced lignin alfalfa hay fed to horses. *J. Anim. Sci.* 99, 1–10. <https://doi.org/10.1093/jas/skab158>
- Grimm, P., Combes, S., Pascal, G., Cauquil, L., Julliand, V., 2020. Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses. *Br. J. Nutr.* 123, 372–382. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002824>
- Grimm, P., Philippeau, C., Julliand, V., 2017. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. *Animal* 11, 1136–1145. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002779>
- Hansen, N.C.K., Avershina, E., Mydland, L.T., Næsset, J.A., Austbø, D., Moen, B., Måge, I., Rudi, K., 2015. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* 26, 1–8. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27216>
- Harlow, B.E., Lawrence, L.M., Hayes, S.H., Crum, A., Flythe, M.D., 2016. Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. *PLoS One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154037>

- Harris, P.A., Ellis, A.D., Fradinho, M.J., Jansson, A., Julliand, V., Luthersson, N., Santos, A.S., Vervuert, I., 2017. Review: Feeding conserved forage to horses: Recent advances and recommendations. *Animal* 11, 958–967.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731116002469>
- Hendrix, D.L., 1993. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci.* 33, 1306–1311.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060037x>
- Henneke, D.R., Poiter, G.D., Kreider, J.L., Yeates, B.F., 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J.* 15, 371–372.
- Hesta, M., Costa, M., 2021. How Can Nutrition Help with Gastrointestinal Tract-Based Issues? *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 37, 63–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2020.12.007>
- Hussein, H.S., Vogedes, L.A., Fernandez, G.C.J., Frankeny, R.L., 2004. Effects of cereal grain supplementation on apparent digestibility of nutrients and concentrations of fermentation end-products in the feces and serum of horses consuming alfalfa cubes. *J. Anim. Sci.* 82, 1986–1996.  
<https://doi.org/10.2527/2004.8271986x>
- Jansson, A., Lindberg, J.E., 2012. A forage-only diet alters the metabolic response of horses in training. *Animal* 6, 1939–1946.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731112000948>
- Jensen, R.B., Austbø, D., Blache, D., Bach Knudsen, K.E., Tauson, A.H., 2016. The effect of feeding barley or hay alone or in combination with molassed sugar beet pulp on the metabolic responses in plasma and caecum of horses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 214, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.003>
- Julliand, V., Fombelle, A. De, Drogoul, C., Jacotot, E., 2001. FEEDING AND MICROBIAL DISORDERS IN HORSES: PART 3—EFFECTS OF THREE HAY:GRAIN RATIOS ON MICROBIAL PROFILE AND ACTIVITIES. *J. Equine Vet. Sci.* 21, 543–546.
- Kristoffersen, C., Jensen, R.B., Avershina, E., Austbø, D., Tauson, A.H., Rudi, K., 2016. Diet-dependent modular dynamic interactions of the equine cecal microbiota. *Microbes Environ.* 31, 378–386.  
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16061>
- Lanzetta, V.A.S., Rezende, A.S.C. de, Saliba, E. de O.S., Lana, Â.M.Q., Rodriguez, N.M., Moss, P.C.B., 2009. Validação do Lipe ® como método para determinar a digestibilidade dos nutrientes em equinos. *Rev. Bras. Zootec.* 38, 69–74.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000100009>
- Miraglia, N., Bergero, D., Polidori, M., Peiretti, P.G., Ladetto, G., 2006. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. *Livest. Sci.* 100, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.11.003>
- Muhonen, S., Sadet-Bourgeteau, S., Julliand, V., 2021. Effects of differences in fibre composition and maturity of forage-based diets on the microbial ecosystem and its activity in equine caecum and colon digesta and faeces. *Animals* 11, 1–14.  
<https://doi.org/10.3390/ani11082337>



- NRC, 2007. Nutrient Requirements of Horses : Sixth Revised Edition Committee on Nutrient Requirements of Horses , National Research Committee on Nutrient Requirements of Horses Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies.
- Ochonski, P., Douthit, T., Drouillard, J., Vahl, C., Lattimer, J., 2019. Changes in cecal environment and forage intake of horses fed increasing amounts of starch. *J. Equine Vet. Sci.* 76, 70. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.081>
- Ochonski, P., Drouillard, J.S., Douthit, T.L., Vahl, C., Lattimer, J.M., 2021. Caecal fermentation characteristics of commonly used feed ingredients. *Equine Vet. J.* 53, 1056–1062. <https://doi.org/10.1111/evj.13390>
- Paßlack, N., Vahjen, W., Zentek, J., 2020. Impact of Dietary Cellobiose on the Fecal Microbiota of Horses, *Journal of Equine Veterinary Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103106>
- Pond, W.G.; Church, D.C.; Pond, K.R. *Animal nutrition and feeding*. 4. ed. New York:John Wiley & Sons, 1995. 615 p.
- Raspa, F., Vervuert, I., Capucchio, M.T., Colombino, E., Bergero, D., Forte, C., Greppi, M., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Antoniazzi, S., Cavallini, D., Valvassori, E., Valle, E., 2022. A high-starch vs. high-fibre diet: effects on the gut environment of the different intestinal compartments of the horse digestive tract. *BMC Vet. Res.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03289-2>
- Sadet-Bourgeteau, S., Philippeau, C., Julliard, V., 2017. Effect of concentrate feeding sequence on equine hindgut fermentation parameters. *Animal* 11, 1146–1152. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002603>
- Saliba, E.O.S. 2005 Mini-curso sobre o uso de indicadores. In: Teleconferência sobre indicadores em nutrição animal, 1, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 23-35.
- Santos, T.M, Almeida, F.Q. de, Godoi, F.N. de, Silva, V.P., França, A.B., Santiago, J.M., Santos, C.S. dos, 2009. Capacidade tamponante, pH e consistência das fezes em equinos submetidos à sobrecarga dietética com amido. *Ciência Rural* 39, 1782–1788. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009005000123>
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Shepherd, M.L., Ponder, M.A., Burk, A.O., Milton, S.C., Swecker, W.S., 2014. Fibre digestibility, abundance of faecal bacteria and plasma acetate concentrations in overweight adult mares. *J. Nutr. Sci.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.8>
- SAS Institute Base SAS® 9.4 **Procedures Guide: Statistical Procedures**. 2nd ed. Cary, NC, USA: Editora SAS Institute Inc., 2013, 550 p.
- Sorensen, R.J., Drouillard, J.S., Douthit, T.L., Ran, Q., Marthaler, D.G., Kang, Q., Vahl,

- C.I., Lattimer, J.M., 2021. Effect of hay type on cecal and fecal microbiome and fermentation parameters in horses. *J. Anim. Sci.* 99, 1–10. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa407>
- Uribe Diaz, A.D.P., Santana, A.E., Araujo Valadão, C.A., De Souza, A.H., 2010. Canulação Cecal Em Equinos. *Ciência Anim. Bras.* 11, 357–362. <https://doi.org/10.5216/cab.v11i2.1206>
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vervuert, I., Voigt, K., Hollands, T., Cuddeford, D., Coenen, M., 2009. Effect of feeding increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in healthy horses. *Vet. J.* 182, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.04.011>
- Warzecha, C.M., Coverdale, J.A., Janecka, J.E., Leatherwood, J.L., Pinchak, W.E., Wickersham, T.A., McCann, J.C., 2017. Influence of short-term dietary starch inclusion on the equine cecal microbiome. *J. Anim. Sci.* 95, 5077–5090. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1754>
- Weinert-Nelson, J.R., Biddle, A.S., Williams, C.A., 2022. Fecal microbiome of horses transitioning between warm-season and cool-season grass pasture within integrated rotational grazing systems. *Anim. Microbiome* 4. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00192-x>
- Williams, T., Rude, B., Liao, S., Mochal-King, C., Nicodemus, M., 2017. Effects of feeding fat on nutrient digestion in cannulated ponies fed a forage diet. *Anim. Husbandry, Dairy Vet. Sci.* 1, 1–5. <https://doi.org/10.15761/ahdvs.1000116>
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42, 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Zeyner, A., Geißler, C., Dittrich, A., 2004. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 88, 7–19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2004.00447.x>

## 5 CAPITULO 2

Esse artigo foi submetido na revista *Frontiers in Microbiology*, com fator de impacto de 5,2 (2022).

### **Dietas com diferentes fontes energéticas afetam a composição, abundância e diversidade da microbiota cecal e fecal de equinos hígidos**

**Laura A. Brandi<sup>1\*</sup>, Ricardo L. M. Sousa<sup>2</sup>, Heidge Fukumasu<sup>2</sup>, Julio C. C. Balieiro<sup>3</sup>, Roberta A. Brandi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>School of Animal Science and Food Engineering FZEA – University of Sao Paulo-USP, Animal Science, Pirassununga, Sao Paulo, Brazil

<sup>2</sup>School of Animal Science and Food Engineering FZEA – University of Sao Paulo-USP, Veterinary Medicine, Pirassununga, Sao Paulo, Brazil

<sup>3</sup>School of Veterinary Medicine and Animal Science FMVZ – University of São Paulo-USP, Animal Nutrition and Production, Pirassununga, Sao Paulo, Brazil

**\* Correspondence:**

Corresponding Author

[laura.brandi@usp.br](mailto:laura.brandi@usp.br)

**Keywords:** archaea<sup>1</sup>, bacteria<sup>2</sup>, concentrate<sup>3</sup>, horse<sup>4</sup>, hay<sup>5</sup>, large intestine<sup>6</sup>, protozoarios<sup>7</sup>, oil<sup>8</sup>

## Resumo

O conhecimento da microbiota intestinal e fecal, e o efeito de dieta sobre elas, é essencial para entender as necessidades nutricionais e a contribuição para a saúde dos equinos. A presente pesquisa se propõe a determinar e comparar o efeito de dietas a base de volumoso (exclusivamente), fibra e óleo, e açúcar e amido sobre a composição, diversidade, abundância e da microbiota no líquido cecal e nas fezes de equinos hípidos. Foram utilizados cinco cavalos alimentados com dietas a base exclusivamente de feno-dieta Feno, ou acrescidas de concentrado, dieta Amido e açúcar (AA), e dieta Fibra e óleo (FO). Para a análise microbiana, foram coletadas amostras cecais e amostras fecais. O Sequenciamento 16S rRNA foi utilizado para determinar a microbiota e a quantificação relativa q-PCR foi realizada para a análise de archaea e protozoário. Nas amostras cecais e fecais, houve efeito de dieta sobre as bactérias em níveis de filo, família e gênero. No ceco e nas fezes os filos de maiores abundâncias relativas (>1%) foram Bacteroidota, Firmicutes, Spirochaetota, Fibrobacterota e Verrucomicrobiota. Em nível de abundância relativa de família e gênero (>1%) no ceco e nas fezes, na dieta Feno foi encontrado bactérias fibrolíticas e celulolíticas. Na dieta AA, foi encontrado o gênero *Streptococcus*, associado a presença do amido. Na dieta FO foram encontrados famílias e gêneros, relacionadas a bactérias pectinolítica, proteolítica (*Prevotellaceae*) e lipídica (gênero *Anaerovibrio*). Não houve efeito de dieta sobre a quantificação de archaea e protozoário no ceco e nas fezes. As fezes não são representativas da população da microbiota do ceco Dietas a base de fibra; fibra e óleo; e amido e açúcar, influenciam na abundância da microbiota cecal e fecal, na diversidade fecal, mas não influenciam diversidade da microbiota cecal de equinos hípidos. Dietas a base de FO se mostraram seguras para substituir dietas com AA. A quantificação e atuação de archaeas e protozoários precisa ser melhor explorada para equinos.

## 1. Introdução

O trato gastrointestinal dos equinos contém uma microbiota composta por bactérias, archaea, fungos e protozoários (DOUGAL *et al.*, 2014b) os quais desempenham papel fundamental na degradação dos alimentos (JULLIAND; GRIMM, 2016) e na saúde intestinal (Garber *et al.*, 2020). Protozoários atuam na degradação da fibra (Laho *et al.*, 2013; Elghandour *et al.*, 2019) e do amido (Hua *et al.*, 2022), enquanto archaeae possuem uma função indireta, auxiliando a atividade fúngica anaeróbica sobre a parede celular da fibra (Lee and Ha, 2000; Fen *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2020). Informações sobre a população e ação ainda são escassas em equinos.

Atualmente aceita-se a avaliação da microbiota das fezes como representativo da microbiota intestinal, porém as amostras de fezes são representativas apenas do cólon dorsal direito (Dougal *et al.*, 2012, 2013), o que torna ideal a avaliação de mais compartimentos (em especial do ceco e colón) para inferir sobre a ação da dieta (Costa *et al.*, 2015). Poucos estudos que analisaram o efeito da dieta sobre a microbiota avaliaram amostras de mais de um compartimento (GRIMM *et al.*, 2020; MUHONEN; SADET-BOURGETEAU; JULLIAND, 2021; SORENSEN *et al.*, 2021).

Equinos conseguem atender a sua exigência nutricional com dietas a base exclusivamente de fibras (NRC, 2007), porém quando a exigência nutricional aumenta, são comuns a utilização de dietas com altas concentrações de grãos (DOUGAL *et al.*, 2014b) que podem levar a sobrecarga de amido e alterações na microbiota intestinal (Kristoffersen *et al.*, 2016; Warzecha *et al.*, 2017).

A microbiota das fezes de equinos hígidos alimentados com dietas a base de fibra e a base de fibra e óleo apresentam semelhanças na composição microbiana, com predominância de *bactérias celulolíticas e fibrolíticas como Fibrobacteraceae, e Prevotellaceae* (Dougal *et al.*, 2014), enquanto que em dietas com alta proporção de grãos, é observado aumento da população de bactérias fermentadoras de carboidratos não estruturais como *Lactobacillaceae* e *Streptococcus*, o que altera os parâmetros fermentativos gerando riscos à saúde dos equinos (HARLOW *et al.*, 2016; JULLIAND *et al.*, 2001; JULLIAND; GRIMM, 2017; KRISTOFFERSEN *et al.*, 2016). Dietas a base de fibra e óleo vem sendo uma alternativa suprimindo a demanda energética, sem afetar a saúde intestinal do cavalo (DUNNETT; MARLIN; HARRIS, 2002; KABE *et al.*, 2016; VERVUERT; KLEIN; COENEN, 2010).

São limitados os estudos que buscaram compreender a composição da microbiota em cavalos saudáveis, e que utilizam dietas com outras fontes energéticas alternativas ao amido (DOUGAL *et al.*, 2014b; SORENSEN *et al.*, 2021; WUNDERLICH *et al.*, 2023; ZHU *et al.*, 2021). A utilização de dietas a base de fibra e óleo podem manter o perfil da microbiota mais próximo a dieta a base de volumoso (exclusivamente) e com isso, manter a saúde gastrointestinal do cavalo. A presente pesquisa se propõem a determinar e comparar o efeito de dietas a base de volumoso (exclusivamente), fibra e óleo, e açúcar e

amido sobre a diversidade, abundancia e população da microbiota no liquido cecal e nas fezes de equinos hígdos

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1.Comitê de ética**

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, sob protocolo número CEUA 2057/21.

### **2.2.Desenha experimental e Coleta de dados**

Foram utilizados cinco equinos hígdos, sem raça definida, machos e fêmeas, com idade de 10 anos ( $SE \pm 2,6$ ) e 384kg ( $SE \pm 9,51$  kg) de peso vivo, alojados individualmente em baias contendo bebedouro automático e comedouro. Diariamente foram soltos em piquete de terra com acesso a água e, sem acesso ao pasto, por quatro horas, duas horas no período da manhã e duas horas no período da tarde.

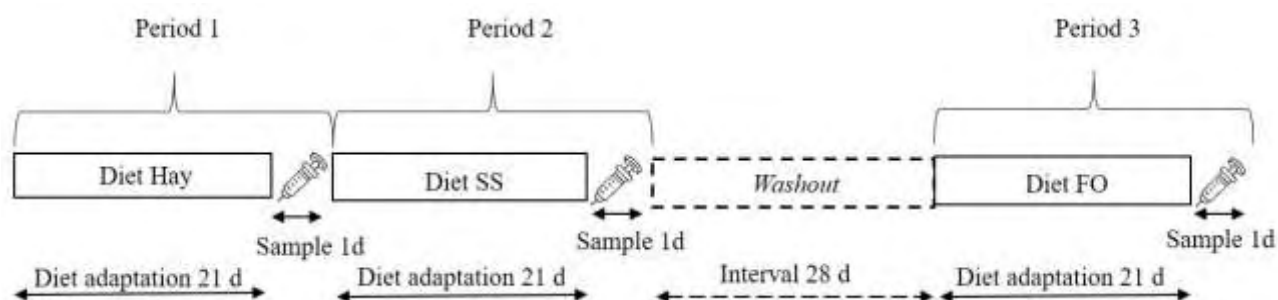
Foram testadas três dietas, a dieta Feno que consistiu exclusivamente de feno (Tifton-85), a dieta amido e açúcar (AA) e a dieta fibra e óleo (FO). As dietas foram calculadas para atender à exigência nutricional de cavalos em manutenção segundo preconizado pelo NRC (2007) (National Research Council), respeitando-se a proporção de 70% de volumoso e 30% de concentrado, em base de matéria seca. A quantidade de alimento oferecido (em base de MS) na dieta Feno foi de 8,4kg ( $SE \pm 1,36$  kg), na dieta AA foi de 5,38kg ( $SE \pm 0,15$  kg) de feno Tifton-85 e 2,6 kg ( $SE \pm 0,07$  kg) de concentrado (base de amido e açúcar) e na dieta FO foi de 4,28kg ( $SE \pm 2,39$  kg) de feno Tifton-85 e 1,9kg ( $SE \pm 0,00$ kg) de concentrado (base de fibra e óleo) acrescido de 300ml de óleo de soja. Nas dietas com adição de concentrado (AA e FO), a proporção de volumoso:concentrado em base de matéria seca (MS) foi de 70:30, e em base de energia foi de 56:44 (Tabela 1). Atentou-se para que as dietas não ultrapassassem a inclusão máxima de amido de 1,1g/kg de PV/ refeição (VERVUERT *et al.*, 2009), que as dietas apresentassem os níveis de proteína e energia os mais próximos possíveis, e atendessem a quantidade mínima de 30% de FDN da dieta (BRAGA *et al.*, 2008).


**Tabela 1.** Composição químicas das dietas Feno, Amido e Açúcar (AA) e Fibra e Óleo (FO), respeitando a relação volumoso: concentrado 70:30, em base de MS.

Nutrientes das dietas/ Dietas	Dieta F	Dieta AA	Dieta FO
Matéria Seca (%)	93,59	92,28	93,22
Matéria Mineral (%MS)	8,36	9,32	6,61
Proteína Bruta(%MS)	12,86	13,93	13,66
Extrato Etéreo(%MS)	1,42	2,72	5,36
Fibra em detergente neutro(%MS)	74,04	59,78	61,91
Fibra em detergente ácido(%MS)	39,8	31,06	34,23
Fibra Bruta (%MS)	36,94	28,39	31,46
Hemicelulose(%MS)	34,24	28,71	27,68
Amido(%MS)	0,1	6,73	2,34
Energia Digestível Estimada(Mcal/kg)*	1,62	1,91	2,16
Energia Bruta(Mcal/g)	4,16	4,03	4,04

\* ED estimada(ração) =  $4,07 - 0,55 * (FDA\%)$  e,  $ED(\text{feno}) = 2,118 + (0,01218 * PB) - (0,0093 * FDA) - [0,00383 * (FDN - FDA)] + (0,04718 * EE) - (0,0262 * MM)$  NRC (2007). MS, Matéria Seca.

Foi utilizado Delineamento Cross Over. Cada período experimental foi de 21 dias para adaptação a dieta, seguida de um dia de coleta amostral (Figura 1). A sequência das dietas testadas foi a dieta feno, AA e FO. O período de intervalo entre as dietas foi de 28 dias (*washout*) em que os cavalos foram soltos em piquetes durante o dia e, a noite permaneciam nas baias, recebendo feno Tifton 85 à vontade e sal mineralizado (50g/dia).



**Figura 1.** Desenho experimental do estudo e distribuição dos períodos de adaptação as dietas e períodos de coletas do líquido cecal e fezes para determinação da microbiota. Dieta AA, dieta amido e açúcar; Dieta FO, dieta fibra e óleo; d, dia; , coleta amostral do líquido cecal e das fezes.

Para a coleta das amostras do líquido cecal foi realizada a canulação no ceco dos cavalos seguindo metodologia adaptada de Uribe Diaz et al. (2010) e Kristoffersen et al., (2016) e as amostras fecais foram coletadas diretamente do reto, segundo Grimm et al., (2020). Para a análise da microbiota, 10mL do líquido cecal e 10g das fezes foram aliqüotados em volumes de 5mL armazenados em criotubos de 5 mL e congelados a -80°C em nitrogênio líquido, para posteriormente serem descongeladas e analisadas no laboratório, segundo a metodologia adaptada de Paßlack et al., (2020).

### **2.3.Extração de DNA e Sequenciamento 16S rRNA**

A extração de DNA da microbiota foi realizada utilizando o kit comercial GenElute Stool DNA (SIGMA-Aldrich, Darmstadt, DE) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e concentração do DNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop One/One (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). A preparação da biblioteca foi realizada de acordo com as recomendações da Illumina (Illumina, San Diego, Ca, EUA) envolvendo duas PCRs, duas etapas de purificação, quantificação, normalização, multiplexação e desnaturação da biblioteca.

A primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica da região V4 hipervariável do 16SrRNA utilizando os primers 16S-515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 16S-805R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose para verificar os produtos quanto ao tamanho esperado (291 pb). Índices de código de barras (NEXTERA<sup>®</sup> XT DNA SMP Prep Kit) foram adicionados a todas as amostras para permitir a multiplexação delas. Amplicons foram agrupados em proporções equimolares das bibliotecas e sequenciados pelo sistema Illumina MiSeq usando o kit de reagente v2 (300 ciclos). As leituras direta e reversa (ferramenta BBMerge; Bushnell et al., 2017) foram combinadas, de multiplexadas e analisadas utilizando o banco de dados SILVA versão 138.1 (SCHLOSS *et al.*, 2009; YILMAZ *et al.*, 2014).

### **2.4.Bioinformática**

Os dados foram analisados conforme Callahan et al. (2016). O pacote DADA2 versão 1.24.0, implementado no software R versão 4.2.3, foi utilizado para controle de qualidade e determinação das contagens de sequência, e com a função `assignTaxonomy` do banco de dados SILVA versão 138.1, as taxonomias foram atribuídas a cada variante de sequenciamento de amplicon (ASV). As ASVs com menos de 5 contagens não foram incluídas na análise por razões de maior confiança nas leituras de sequência e viés reduzido por possíveis erros de sequência (HUSE *et al.*, 2007). A reutilização com uma representação igual a 10.000 sequências / amostra foram utilizadas para normalização das leituras de sequência (WEISS *et al.*, 2017).

Para a determinação da diversidade microbiana, foram analisadas a diversidade utilizando-se o índice Shannon e o índice de riqueza por Chao1, e para a análise de abundância relativa foi assumido um valor significativo de  $p \leq 0,01$ , utilizando o pacote DADA2 versão 1.24.0 (PASSLACK; VAHJEN; ZENTEK, 2020; SCHLOSS *et al.*, 2009; WARZECHA *et al.*, 2017).

### **2.5.Quantificação de Archaea e Protozoário**



O desenho dos primers usados para o PCR em tempo real são descritos na Tabela 2. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador CFX96™ (Bio-Rad) em um volume final de 10 µL de reação por poço contendo 2x qPCR BIO SyGreen Mix (PCRBiosystems, London, UK), 25 ng/µl de DNA, 300 nM de cada primer para archaea e bactéria total, e 100 nM para cada primer de protozoário. Um controle negativo foi realizado em cada placa para detectar possíveis contaminantes ou a formação de dímeros de primers. As condições de ciclagem para archaea e bactéria total foram: 95°C por 20s seguido de 40 ciclos de 95°C por 3s, 60°C por 30s e 79°C por 10s; e para protozoário foram: 95°C por 20s seguido de 40 ciclos de 95°C por 3s e 60°C por 30s. Imediatamente, após a amplificação, uma curva de melting foi realizada. A quantificação relativa das populações foi realizada segundo metodologia descrita por Denman e McSweeney, (2006), na qual o total do gene 16S rRNA amplificado pelo primer de bactéria total foi usado como gene endógeno para normalização dos dados de archaea e protozoário.

**Tabela 2** Primers e amplicon utilizados na quantificação relativa de rDNA de archaea e protozoários em relação ao total de bactérias por q-PCR.

<b>Primers</b>	<b>Sequência 5' 3'</b>	<b>Amplicon</b>
Bactéria Total - 1114F	CGGCAACGAGCGCAACCC	130 bp
Bactéria Total - 1275R	CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	
Archaea - 958F	AATTGGAKTCAACGCCGGR	142 bp
Archaea - 1100R	TGGGTCTCGCTCGTTG	
Protozoário - 316F	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT	223 bp
Protozoário - 539R	CTTGCCCTCYAATCGTWCT	

## 2.6. Análise Estatística

Para as análises das informações da microbiota, para cada microrganismo observado em determinado táxon, foi utilizado um modelo misto linear generalizado, assumindo que a abundância de cada microrganismo segue distribuição binomial. Neste caso, utilizou-se função de ligação logística para relacionar as abundâncias observadas aos componentes sistemáticos do modelo estatístico. O modelo estatístico contemplou o efeito fixo de dietas, além do efeito aleatório de animal. Para a análise da diversidade foram utilizados os índices de Shannon e Chao1. Neste caso, considerou-se um modelo linear misto geral que contemplou o efeito fixo de dietas, além do efeito aleatório de animal. Em ambas as análises, o efeito aleatório de animal foi considerado fator de variação e as medidas repetidas dentro do animal foram consideradas condições de avaliação, refletindo a estrutura de correlação dentro dos animais. Diferentes estruturas de covariâncias foram avaliadas e selecionadas pela comparação do modelo, com base no critério de AIC proposto por Akaike, (1974). Em caso de estatística F significativa para a fonte de variação dieta, adotou-se como procedimento de comparação de médias o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED e GLIMMIX do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, 2013).

### 3. Resultados

#### 3.1. Dados do Sequenciamento 16S rRNA

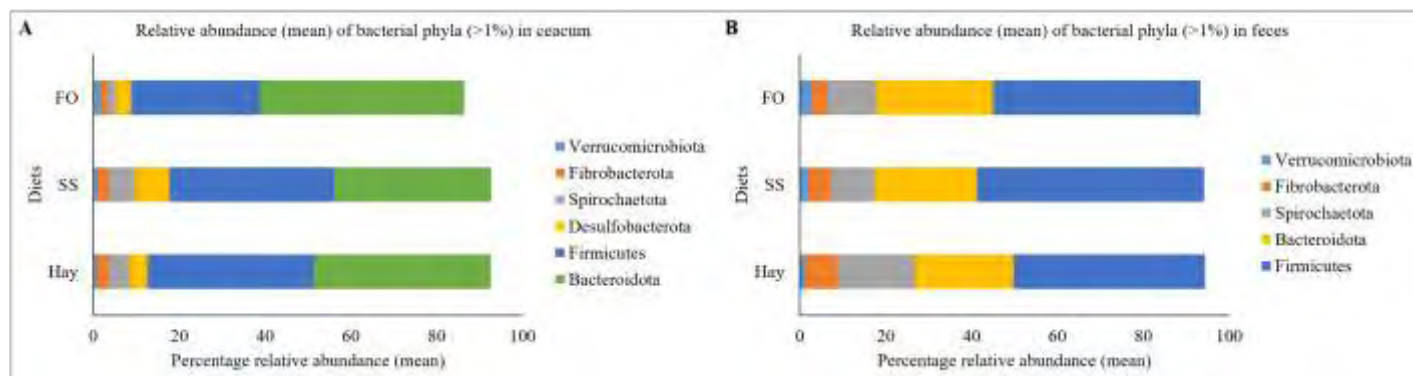
Após o sequenciamento foi obtido uma pontuação de qualidade (Qscore) de 91,49%, que pode ser considerado um resultado com alta confiança (ILLUMINA, 2014; MANLEY; MA; LEVINE, 2016).

Com o sequenciamento, foram encontrados no total 8.316 reads para todas as amostras (ceco+fezes), depois da filtragem, foram geradas 3.351.219 reads para todas as amostras (ceco+fezes) (média de 124.119 reads por amostra com variação individual entre 95.765 e 13.3037 reads. Para as amostras do líquido cecal, após a filtragem, foram geradas entre 3305 e 3937 de variante de sequenciamento de amplicon (ASVs) (média de 13.668 ASVs), e as amostras fecais apresentaram entre 4395 e 6045 ASVs (média de 6.073 ASVs) considerando as três dietas juntas.

#### 3.2. Microbiota cecal e fecal

Utilizando-se a filtragem dos táxons mais frequentes (>5%), no ceco foi encontrado um total da classe taxonômica de 20 filos, 77 famílias e 211 gêneros. Nas fezes foram encontrados 20 filos, 107 famílias e 211 gêneros. Entre os 20 filos encontrado no ceco, independente da dieta oferecida, cinco filos foram os de maior abundância relativa (>1%) Bacteroidota, Firmicutes, Desulfobacterota, Spirochaetota, Fibrobacterota e Verrucomicrobiota (Figura 2A). Observou-se que os filos Firmicutes e Fibrobacterota tiveram abundância relativa semelhantes entre as dietas Feno e AA. Houve o aumento dos filos Desulfobacterota e Spirochaetota na dieta AA e dos filos Bacteroidota e Verrucomicrobiota na dieta FO (Tabela 3).

Nas fezes, a quantidade de filos mais abundantes, independente das dietas (>1%) foram os mesmo que encontrados no ceco, com excessão do filo Desulfobacterota (Figura 2B). Foi observado o aumento de Spirochaetota e Fibrobacterota na dieta Feno, Firmicutes na dieta AA e o filo Verrucomicrobiota continuou a ser maior na dieta FO (Tabela 3).



**Figura 2.** Abundancia relativa média dos principais filios bacterianos (>1%) no ceco (A) e nas fezes (B) das dietas Feno, deita Amido e Açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO).

**Tabela 3.** Efeito de dieta sobre a abundancia relativa (>1%) dos filios das bactérias, no ceco e fezes, em cavalos alimentados com dieta Feno, dieta Amido e Açúcar (AA) e deita Fibra e óleo (FO)(Valores médios com seus erros padrão).

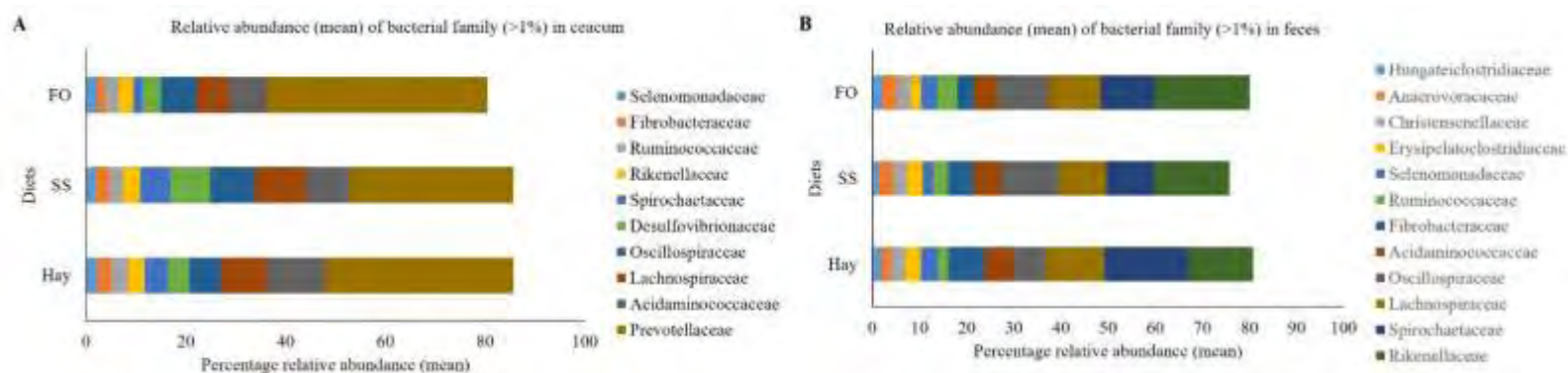
Filo/Local amostral	Dietas					
	Feno		AA		FO	
Ceco	Media (%)	SE	Média (%)	SE	Média (%)	SE
Bacteroidota	41,19 <sup>b</sup>	2,34	36,49 <sup>c</sup>	2,24	47,62 <sup>a</sup>	2,41
Firmicutes	38,63 <sup>a</sup>	1,21	38,42 <sup>a</sup>	1,21	29,93 <sup>b</sup>	1,08
Desulfobacterota	4,33 <sup>b</sup>	0,93	8,02 <sup>a</sup>	1,65	3,61 <sup>c</sup>	0,78
Spirochaetota	4,70 <sup>b</sup>	1,09	6,10 <sup>a</sup>	1,39	1,94 <sup>c</sup>	0,46
Fibrobacterota	2,88 <sup>a</sup>	0,71	2,73 <sup>a</sup>	0,67	1,61 <sup>b</sup>	0,4
Verrucomicrobiota	0,78 <sup>c</sup>	1,17	0,90 <sup>b</sup>	1,35	1,66 <sup>a</sup>	2,46
Fezes	Média(%)	SE	Média(%)	SE	Média(%)	SE
Firmicutes	44,64 <sup>c</sup>	1,32	52,80 <sup>a</sup>	1,33	48,24 <sup>b</sup>	1,33
Bacteroidota	22,99 <sup>c</sup>	1,02	23,93 <sup>b</sup>	1,05	27,19 <sup>a</sup>	1,15
Spirochaetota	17,91 <sup>a</sup>	1,06	10,16 <sup>c</sup>	0,66	11,45 <sup>b</sup>	0,74
Fibrobacterota	7,74 <sup>a</sup>	0,87	5,25 <sup>b</sup>	0,61	3,63 <sup>c</sup>	0,43
Verrucomicrobiota	1,15 <sup>c</sup>	0,13	1,97 <sup>b</sup>	0,23	2,27 <sup>a</sup>	0,31

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, em cada linha ( $p > 0,01$ ). SE= standard error

Quando se analisou as amostras em nível de família, foram encontradas no ceco, independente da dieta, 10 famílias que tiveram abundancia relativa >1% (Figura 3A). Para cada uma das famílias foi observado o efeito de dieta ( $p < 0,01$ ). A família *Acidaminococceae* e *Ruminococcaceae* foram as mais abundantes na dieta Feno, enquanto que as família *Lachnospiraceae*, e *Spirochataceae* foram maiores na dieta AA, e a família *Prevotellaceae* foi maior na dieta FO(Tabela 4).

Nas fezes, 12 famílias tiveram abundancia relativa >1% independente das dietas (Figura 3B). Em cada uma das famílias foi encontrado o efeito de dieta ( $p < 0,01$ ). A dieta Feno

teve maior abundância relativa da *Spirochaetaceae*, *Lachnospiraceae*, *Fibrobacteraceae* e *Selenomonadaceae*. A dieta AA teve abundância relativa da família *Acidaminococceae* semelhante a dieta Feno e, na dieta FO as famílias *Rikenellaceae* e *Ruminococcaceae* foram as mais abundantes (Tabela 4).



**Figura 3.** Abundância relativa média das principais famílias bacterianas (>1%) no ceco (A) e nas fezes (B) das dietas Feno, dieta Amido e Açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO).

**Tabela 4.** Efeito de dieta sobre as principais famílias bacterianas com abundância relativa (>1%), no ceco e fezes, em cavalos alimentados com dieta Feno, dieta Amido e Açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO) (Valores médios com seus erros padrão).

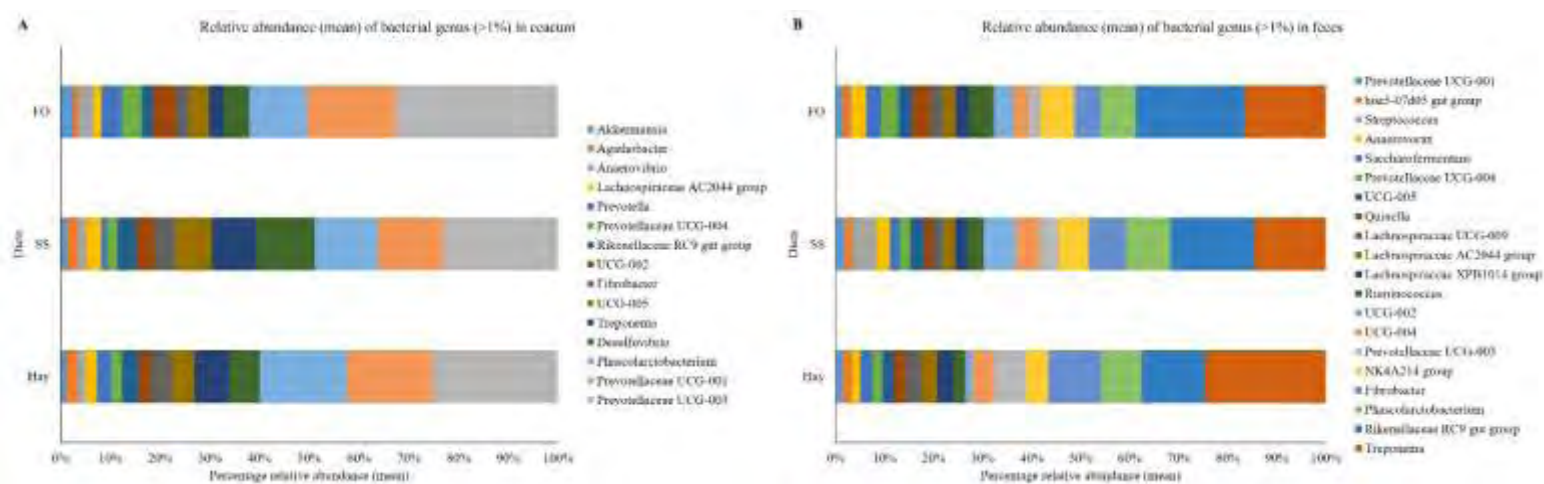
Família/Local amostral	Dietas					
	Ceco	Feno		AA		FO
	Média(%)	SE	Média(%)	SE	Média(%)	SE
<i>Prevotellaceae</i>	37,80 <sup>b</sup>	2,40	32,95 <sup>c</sup>	2,25	44,27 <sup>a</sup>	2,52
<i>Acidaminococceae</i>	11,64 <sup>a</sup>	1,52	8,64 <sup>b</sup>	1,17	7,63 <sup>c</sup>	1,04
<i>Lachnospiraceae</i>	9,36 <sup>b</sup>	0,48	10,19 <sup>a</sup>	0,52	6,58 <sup>c</sup>	0,35
<i>Desulfovibrionaceae</i>	4,33 <sup>b</sup>	0,93	8,02 <sup>a</sup>	1,65	3,61 <sup>c</sup>	0,78
<i>Spirochaetaceae</i>	4,70 <sup>b</sup>	1,09	6,10 <sup>a</sup>	1,39	1,94 <sup>c</sup>	0,46
<i>Rikenellaceae</i>	3,11 <sup>ab</sup>	0,33	3,33 <sup>a</sup>	0,35	2,92 <sup>b</sup>	0,31
<i>Ruminococcaceae</i>	3,53 <sup>a</sup>	0,23	2,78 <sup>b</sup>	0,19	2,74 <sup>b</sup>	0,19
<i>Fibrobacteraceae</i>	2,89 <sup>a</sup>	0,71	2,73 <sup>a</sup>	0,67	1,62 <sup>b</sup>	0,40
<i>Selenomonadaceae</i>	2,13 <sup>a</sup>	0,20	1,99 <sup>a</sup>	0,19	2,14 <sup>a</sup>	0,20
	Feno		AA		FO	
Fezes	Média(%)	SE	Média(%)	SE	Média(%)	SE
<i>Rikenellaceae</i>	13,70 <sup>c</sup>	0,97	16,11 <sup>b</sup>	1,11	20,18 <sup>a</sup>	1,32
<i>Spirochaetaceae</i>	17,86 <sup>a</sup>	1,06	10,11 <sup>c</sup>	0,66	11,38 <sup>b</sup>	0,73
<i>Lachnospiraceae</i>	12,50 <sup>a</sup>	0,87	9,91 <sup>c</sup>	0,71	11,05 <sup>b</sup>	0,78
<i>Acidaminococceae</i>	6,06 <sup>a</sup>	0,40	6,16 <sup>a</sup>	0,40	4,85 <sup>b</sup>	0,33
<i>Fibrobacteraceae</i>	7,74 <sup>a</sup>	0,87	5,25 <sup>b</sup>	0,61	3,63 <sup>c</sup>	0,43
<i>Ruminococcaceae</i>	2,19 <sup>c</sup>	0,19	3,09 <sup>b</sup>	0,26	4,27 <sup>a</sup>	0,35
<i>Selenomonadaceae</i>	3,68 <sup>a</sup>	0,83	2,31 <sup>c</sup>	0,53	3,45 <sup>b</sup>	0,78

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, em cada linha ( $p > 0,01$ ). SE= standard error

A nível de gênero, no ceco foram encontrados 15 gêneros com abundância relativa >1% (Figura 4A), e todos com efeito de dieta ( $p < 0,01$ ). A dieta FO apresentou maior

abundancia relativa dos gêneros *Anaerovibrio* (filo Firmicutes), *Akkermansia* (filo Verrucomicrobiota) e *Prevotella* e *Prevotellaceae* UCG-003 (filo Bacteroidota). Na dieta AA tivemos a maior abundancia relativa dos gêneros *Treponema* (filo Spirochaetota) e *Lachnospiraceae* AC2044 group (filo Firmicutes). Os gêneros *Fibrobacter* (filo Fibrobacterota), *Rikenellaceae* RC9 gut group (filo Bacteroidetes) foram semelhantes entre a dieta AA e Feno. Já a dieta Feno teve a maior abundancia relativa do gênero *Prevotellaceae* UCG-001 (filo Bacteroidota) (Tabela 5).

Nas fezes, foram encontrados 19 gêneros com abundância relativa >1% (Figura 4B), e todos com efeito de dieta ( $p < 0,01$ ). Na dieta FO houve a maior abundancia relativa dos gêneros *Rikenellaceae* RC9 gut group, *Ruminococcus* (filo Firmicutes) e *Anaerovibrio*. Na dieta Feno teve a maior abundancia relativa dos gêneros *Treponema* e *Fibrobacter*, e na dieta AA o gênero *Streptococcus* (filo Firmicutes) teve a maior abundancia relativa (Tabela 5).



**Figura 4.** Abundancia relativa média dos principais gêneros bacterianos (>1%) no ceco (A) e nas fezes (B) das dietas Feno, deita Amido e Açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO).

**Tabela 5.** Efeito de dieta sobre os principais gêneros de bactérias com abundância relativa (>1%), no ceco e fezes, em cavalos alimentados com dieta Feno, dieta Amido e Açúcar (AA) e deita Fibra e óleo (FO)(Valores médios com seus erros padrão).

Gêneros/Local amostral	Dietas					
	Feno		AA		FO	
	Média(%)	SE	Média(%)	SE	Média(%)	SE
Ceco						
Prevotellaceae UCG-003	16,92 <sup>b</sup>	1,60	15,64 <sup>c</sup>	1,50	21,22 <sup>a</sup>	1,91
Prevotellaceae UCG-001	11,45 <sup>a</sup>	1,76	8,84 <sup>b</sup>	1,40	11,63 <sup>a</sup>	1,79
Desulfovibrio	4,16 <sup>b</sup>	0,92	7,87 <sup>a</sup>	1,67	3,28 <sup>c</sup>	0,73
Treponema	4,63 <sup>b</sup>	1,07	6,09 <sup>a</sup>	1,39	1,88 <sup>c</sup>	0,45
Fibrobacter	2,88 <sup>a</sup>	0,70	2,73 <sup>a</sup>	0,67	1,61 <sup>b</sup>	0,40
Rikenellaceae RC9 gut group	2,27 <sup>a</sup>	0,32	2,50 <sup>a</sup>	0,35	1,42 <sup>b</sup>	0,20
Prevotellaceae UCG-004	1,45 <sup>b</sup>	0,20	1,43 <sup>b</sup>	0,21	2,65 <sup>a</sup>	0,39
Prevotella	1,91 <sup>b</sup>	0,31	0,82 <sup>c</sup>	0,14	2,65 <sup>a</sup>	0,43
Lachnospiraceae AC2044 group	1,52 <sup>b</sup>	0,10	1,97 <sup>a</sup>	0,14	1,05 <sup>c</sup>	0,08
Anaerovibrio	1,13 <sup>b</sup>	0,27	1,16 <sup>b</sup>	0,28	1,94 <sup>a</sup>	0,46
Akkermansia	0,77 <sup>c</sup>	1,16	0,90 <sup>b</sup>	1,348	1,65 <sup>a</sup>	2,46
Fezes						
Treponema	17,76 <sup>a</sup>	1,04	9,96 <sup>c</sup>	0,64	11,25 <sup>b</sup>	0,71
Rikenellaceae RC9 gut group	9,36 <sup>c</sup>	0,85	11,64 <sup>b</sup>	1,04	15,09 <sup>a</sup>	1,29
Fibrobacter	7,74 <sup>a</sup>	0,87	5,25 <sup>b</sup>	0,60	3,63 <sup>c</sup>	0,42
Prevotellaceae UCG-003	4,76 <sup>a</sup>	4,76	2,69 <sup>b</sup>	2,69	1,68 <sup>c</sup>	1,68
Ruminococcus	1,70 <sup>c</sup>	0,17	2,11 <sup>b</sup>	0,22	3,33 <sup>a</sup>	0,34
Lachnospiraceae AC2044 group	2,26 <sup>a</sup>	0,38	1,68 <sup>b</sup>	0,28	1,65 <sup>b</sup>	0,28
Prevotellaceae UCG-004	1,46 <sup>b</sup>	0,24	1,50 <sup>b</sup>	0,25	2,38 <sup>a</sup>	0,40
Streptococcus	0,01 <sup>c</sup>	0,00	3,41 <sup>a</sup>	1,19	0,16 <sup>b</sup>	0,06
Prevotellaceae UCG-001	1,04 <sup>b</sup>	0,12	1,22 <sup>a</sup>	0,14	0,94 <sup>b</sup>	0,11

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, em cada linha ( $p>0,01$ ). SE= standard error

### 3.3.Diversidade microbiana

Na microbiota cecal não foi encontrado efeito de dieta sobre a diversidade da microbiota (índice de Shannon) e riqueza (Chao1) ( $p>0,05$ )(Tabela 6).

Na microbiota fecal, foi observada diferença na diversidade (índice de Shannon) ( $p<0,05$ ). Não foi observado diferença do índice de riqueza (Chao1) entre as dietas ( $p>0,05$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Efeito de dieta sobre o índice de diversidade Shannon e índice de riqueza Chao1, em equinos alimentados com dieta Feno, dieta Amido e açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO).

Index/Local amostral	Dietas					
	Feno		AA		FO	
Ceco	Média	SE	Média	SE	Média	SE
Shannon diversity index	3,18 <sup>a</sup>	0,07	3,22 <sup>a</sup>	0,08	2,97 <sup>a</sup>	0,10
Chao1 riqueza index	159,03 <sup>a</sup>	2,28	161,28 <sup>a</sup>	2,63	158,52 <sup>a</sup>	3,22
Fezes	Feno		AA		FO	
	Média	SE	Média	SE	Média	SE
Shannon diversity index	3,40 <sup>b</sup>	0,03	3,58 <sup>a</sup>	0,03	3,48 <sup>ab</sup>	0,04
Chao1 riqueza index	172,74 <sup>a</sup>	6,03	174,04 <sup>a</sup>	6,03	168,95 <sup>a</sup>	6,73

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, em cada linha ( $p>0,05$ ). SE= standard error

### 3.4. Quantificação relativa de rDNA de bactéria total, archaea e protozoário por q-PCR

No ceco, independente da dieta, encontrou-se maior quantidade de archaea do que protozoário, e o inverso foi observado nas fezes ( $p<0,01$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Quantificação relativa de rDNA de archaea e protozoário por contagem total de bactéria por q-PCR no ceco e fezes de equinos recebendo dieta Feno, dieta Amido e Açúcar (AA) e dieta Fibra e óleo (FO) (Valores médios com seus erros padrão).

Local Amostral		
Ceco	Média	SE
Archaea	2,13 <sup>a</sup>	0,07
Protozoário	1,83 <sup>b</sup>	0,07
Fezes	Média	SE
Archaea	1,93 <sup>b</sup>	0,04
Protozoário	2,07 <sup>a</sup>	0,04

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, em cada coluna ( $p>0,01$ ). SE= standard error

## 4. Discussão

Os valores de abundancia relativas encontrados na presente pesquisa, então em consonância com a literatura para cavalos saudáveis (HANSEN *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2020; WARZECHA *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2021).

A microbiota encontrada no ceco e nas fezes tiveram os mesmos filos, mas com abundância relativa distintas, composta por Bacteroidota (ceco 41,77%, fezes 24,70%),

Firmicutes (ceco 35,66%, fezes 48,56%) Siprochetota (ceco 4,25%, fezes 13,17%), Fibrobacterota (ceco 2,40%, fezes 5,54%) e Verrucomicrobiota (ceco 1,11%, fezes 1,95%). Todos os filos encontrados são de bactéria mais predominantes da microbiota do intestino grosso e fecal em cavalos saudáveis (COSTA *et al.*, 2012, 2015; DOUGAL *et al.*, 2012; HANSEN *et al.*, 2015; MORRISON *et al.*, 2018).

No ceco não houve diferença na diversidade e na riqueza entre as dietas. A ausência da diversidade pode ser considerado positivo, pois é um sinal que as dietas não promoveram riscos à saúde dos cavalos (CHAUCHEYRAS-DURAND *et al.*, 2022; ELZINGA; WEESE; ADAMS, 2016; MORRISON *et al.*, 2018; WARZECHA *et al.*, 2017).

Na microbiota fecal, foi observado diferença entre as dietas na diversidade. Não foi observado diferença no índice de riqueza (Chao1). A dieta AA apresentou maior diversidade seguida de dieta FO e Feno, o que sugere que a adição de concentrado nas dietas AA e FO estimularam o crescimento das bactérias. O fato da diversidade não ter reduzido nas fezes quando os cavalos foram alimentados com a dieta AA, reforça que a adição do concentrado com amido não apresentou risco a saúde intestinal e não promoveu sobrecarga de amido Grimm *et al.*, (2020).

Observou-se maior abundância relativa do gênero *Streptococcus* nas fezes da dieta AA, assim como a maior abundância relativa do filo *Desulfobacterota* (família *Desulfovibrionaceae*, gênero *Desulfovibrio*) e da família *Lachnospiraceae* no ceco, o que sugere-se que mesmo respeitando o limite de ingestão de amido preconizado por Vervuert *et al.*, (2009), parte do amido escapou da digestão no intestino delgado e foi fermentado após a passagem pelo ceco (COLLINET *et al.*, 2021; WARZECHA *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2021), no colón dorsal direito, uma vez que as fezes são utilizadas como representativo deste compartimento (COSTA *et al.*, 2015; DOUGAL *et al.*, 2012; REED *et al.*, 2021).

A maior abundância relativa do filo *Verrucomicrobiota* (gênero *Akkermansia*) no ceco e nas fezes dos cavalos alimentados com a dieta AA, sugere uma resposta protetora da microbiota aos danos que o amido pode causar, pois estão correlacionados com o estado de saúde do equino, melhoria da barreira intestinal e redução da inflamação intestinal (EVERARD *et al.*, 2013; LINDENBERG *et al.*, 2019).

As dietas AA e Feno, no ceco, apresentaram abundância relativa semelhante no filo Firmicutes, o qual possui papel na degradação da parede celular, como também na degradação de amido (BIDDLE; BLACK; BLANCHARD, 2013; KAUTER *et al.*, 2019).

A dieta Feno, no ceco, apresentou a maior abundância da família *Ruminococcaceae*, corroborando com Julliand and Grimm, (2017). No ceco e nas fezes, outras famílias como *Acidaminococceae* e *Selenomonadaceae* (filo Firmicutes), e a família *Fibrobacteraceae* (filo Fibrobacter), responsáveis pela degradação da parede celular também foram mais abundantes na dieta Feno, dados de acordo com Dougal *et al.*, (2014) e Hansen *et al.*, (2015).

O gênero *Treponema* (família *Spirochataceae*) associado a degradação da celulose (KRISTOFFERSEN *et al.*, 2016), foi observado nas fezes, não só na dieta feno, como também na dieta FO concordando com Gomez *et al.*, (2021); Weinert *et al.*, (2021) e Zhu *et al.*, (2021).



A dieta FO, apresentou maior abundancia do gênero *Ruminococcus* nas fezes e no ceco a maior abundancia relativa do gênero *Anaerovibrio* (filo Firmicutes), ambas associadas com dietas lipídicas para cavalos (WARZECHA *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2023).

Por ter fibras de fácil fermentação em sua composição, a dieta FO apresentou maior abundancia relativa do filo Bacteroidetes (família Prevotellaceae, gênero Prevotellaceae UCG-003) associados a quebra dos carboidratos, como também na quebra de proteínas e pectina (Julliard *et al.*, 2018; Collinet *et al.*, 2021; Sorensen *et al.*, 2021), mas também apresentou, nas fezes, maior abundancia relativa da família *Rikenellaceae*, gênero *Rikenellaceae* RC9, associado a degradação de carboidratos estruturais (GRIMM *et al.*, 2020; THEELEN *et al.*, 2021; WEINERT-NELSON; BIDDLE; WILLIAMS, 2022), o que pode estar relacionado a predominância de feno na dieta, o que não ocorreu com Dougal *et al.*, (2014).

Mesmo as dietas utilizadas nesta pesquisa, terem prevalência de feno, não foi observado efeito das dietas sobre a quantificação relativa de archaea no ceco e nas fezes, corroborando com Fernandes *et al.*, (2014), assim como sobre a quantificação relativa de protozoário, concordando com Muhonen *et al.*, (2021).

Independente das dietas, a quantidade de archaea foi maior no ceco, enquanto que a quantidade de protozoários foi maior nas fezes, o que pode estar relacionado ao local de maior disponibilidade do substrato específico de ação de cada um deles, sendo as archaea, ligadas a degradação das fibras, e os protozoários, responsáveis por auxiliar na degradação da parede celular (EDWARDS *et al.*, 2020; FEN *et al.*, 2009; LEE; HA, 2000).

## **5. Conclusão**

As fezes não são representativas da população da microbiota do ceco. Dietas a base de fibra; fibra e óleo; e amido e açúcar, influenciam na abundância da microbiota cecal e fecal, influenciam na diversidade fecal, mas não influenciam diversidade e riqueza da microbiota cecal de equinos hípidos. Dietas a base de FO se mostraram seguras para substituir dietas com AA. A quantificação e atuação de archaeas e protozoários precisa ser melhor explorada para equinos.

## **6. Conflito de Interesse**

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## **7. Contribuição de autores**

LB, RB e JB projetaram o estudo. LB e RB participaram da aquisição dos animais e coleta de amostras. RS, JB e HF ajudaram na análise dos dados. LB e RB contribuíram com a redação do rascunho original. RB e RS ajudaram a revisar e editar o manuscrito. Todos os autores contribuíram com o artigo e aprovaram a versão submetida

## 8. Financiamento

Este estudo foi financiado pela FAPESP, bolsa 2020/12753-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## 9. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, especialmente ao Prof. Dr. Paulo Canola e sua equipe de veterinários pela assistência no manejo dos cavalos durante este programa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## 10. Referencias

AKAIKE, H. A New Look at the Statistical Model Identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716–723, 1974.

AL JASSIM, R. A. M.; ANDREWS, F. M. The Bacterial Community of the Horse Gastrointestinal Tract and Its Relation to Fermentative Acidosis, Laminitis, Colic, and Stomach Ulcers. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 25, n. 2, p. 199–215, 2009.

ARAÚJO, K. V.; DE FREITAS LIMA, J. A.; FIALHO, E. T.; MIYAGI, E. S. Comparação entre os Indicadores Internos e o Método de Coleta Total na Determinação da Digestibilidade dos Nutrientes de Alimentos Volumosos, em Equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 745–751, 2000.

ARGENZIO, R. A.; SOUTHWORTH, M.; LOWE, J. E.; STEVENS, C. E. Interrelationship of Na, HCO<sub>3</sub>, and volatile fatty acid transport by equine large intestine. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism and Gastrointestinal Physiology**, v. 2, n. 6, 1977.

ARROYO, L. G.; ROSSI, L.; SANTOS, B. P.; GOMEZ, D. E.; SURETTE, M. G.; COSTA, M. C. Luminal and mucosal microbiota of the cecum and large colon of healthy and diarrheic horses. **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2020.

BELZECKI, G.; MILTKO, R.; MICHALOWSKI, T.; MCEWAN, N. R. Methods for the cultivation of ciliated protozoa Grzegorz Be l zecki. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363:fnv233, n. November 2015, p. 10–13, 2016.

BIDDLE, A. S.; BLACK, S. J.; BLANCHARD, J. L. An In Vitro Model of the Horse Gut Microbiome Enables Identification of Lactate-Utilizing Bacteria That Differentially Respond to Starch Induction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.

BRAGA, A. C.; ARAÚJO, K. V.; LEITE, G. G.; MASCARENHAS, A. G. Neutral detergent fiber levels in diet of equines. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 11, p. 1965–1972, 2008.

BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E. Importância nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 246–258, 2009.

BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E.; MARTINS, E. N.; VILLELA, E.; FREITAS, V.; QUEIROZ-NETO, A. De; LACERDA-NETO, J. C. De. Parâmetros bioquímicos de equinos submetidos à simulação de prova de enduro recebendo dietas com adição de óleo de soja Biochemical parameters of horses submitted to an endurance simulation receiving diets with soybean oil addition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 313–319, 2010.

BROKNER, C.; AUSTBO, D.; NÆSSET, J. A.; BLACHE, D.; BACH KNUDSEN, K. E.; TAUSON, A. H. Metabolic response to dietary fibre composition in horses. **Animal**, v. 10, n. 7, p. 1155–1163, 2016.

BUSHNELL, B.; ROOD, J.; SINGER, E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2017.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CERBARO, A. E. M.; GONÇALVES, R. N.; LEMES, J. S.; PIEREZAN, M.; LUNKES, V. L.; VAZ, R. Z. Óleo vegetal na dieta de equinos submetidos a exercício. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2525–3409, p. 2–12, 23 ago. 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/7444>>.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; SACY, A.; KARGES, K.; APPER, E. Gastro-Intestinal Microbiota in Equines and Its Role in Health and Disease: The Black Box Opens. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 1–33, 2022.

COLLINET, A.; GRIMM, P.; JULLIAND, S.; JULLIAND, V. Sequential modulation of the equine fecal microbiota and fibrolytic capacity following two consecutive abrupt dietary changes and bacterial supplementation. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2021.

CORREA, G. F.; NASCIMENTO, O. C. A.; MOTA, T. P.; HESPANHOLO, G. O.; MOREIRA, C. G.; MENEZES, M. L.; VERVUERT, I.; BALIEIRO, J. C. C.; BUENO, I. C. S.; BRANDI, R. A. Impact on digestibility, and blood and fecal parameters of replacing wheat bran with corn gluten meal in concentrate of adult horses. **Livestock Science**, v. 186, p. 41–45, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.06.001>>.

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE, J. S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16s rRNA gene. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

COSTA, M. C.; SILVA, G.; RAMOS, R. V.; STAEMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; KIM, P.; WEESE, J. S. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **Veterinary Journal**, v. 205, n.

1, p. 74–80, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.018>>. COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, n. 1, p. 1–12, 2018.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 58, n. 3, p. 572–582, dez. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x>>.

DIREKVANDI, E.; KALANTARI, R. K. Fecal volatile fatty acids and blood metabolites in the turkmen horse associated with type and source of cereal grains. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 1078–1083, 2018.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; GEOR, R. J.; NIELSEN, B. D.; SCHOTT, H. C.; ELZINGA, S.; JAMIE NEWBOLD, C. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–9, 2014.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; EDWARDS, A.; PACHEBAT, J. A.; BLACKMORE, T. M.; WORGAN, H. J.; NEWBOLD, C. J. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 642–652, 2012.

DROGOUL, C.; DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: Effect of three hay:grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 10, p. 487–491, 2001.

DUNNETT, C. E.; MARLIN, D. J.; HARRIS, R. C. Effect of dietary lipid on response to exercise : relationship to metabolic adaptation. **EQUINE EXERCISE PHYSIOLOGY**, v. 34, p. 75–80, 2002.

EDWARDS, J. E.; SHETTY, S. A.; VAN DEN BERG, P.; BURDEN, F.; VAN DOORN, D. A.; PELLIKAN, W. F.; DIJKSTRA, J.; SMIDT, H. Multi-kingdom characterization of the core equine fecal microbiota based on multiple equine (sub)species. **Animal Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 6, 12 dez. 2020. Disponível em: <<https://animalmicrobiome.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42523-020-0023-1>>.

ELZINGA, S. E.; WEESE, J. S.; ADAMS, A. A. Comparison of the Fecal Microbiota in Horses With Equine Metabolic Syndrome and Metabolically Normal Controls Fed a Similar All-Forage Diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 44, p. 9–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.05.010>>.

EVERARD, A.; BELZER, C.; GEURTS, L.; OUWERKERK, J. P.; DRUART, C.;

BINDELS, L. B.; GUIOT, Y.; DERRIEN, M.; MUCCIOLI, G. G.; DELZENNE, N. M.; DE VOS, W. M.; CANI, P. D. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.

FEN, Y.; EDWARDS, J. E.; ALLISON, G. G.; ZHU, W.; THEODOROU, M. K. Bioresource Technology Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4821–4828, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.031>>.

FERNANDES, K. A.; KITTELMANN, S.; ROGERS, C. W.; GEE, E. K.; BOLWELL, C. F.; BERMINGHAM, E. N.; THOMAS, D. G. Faecal microbiota of forage-fed horses in new zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

FRAPE, D. **Equine nutrition and feeding**. 3rd ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2004. 650 p.

GARBER, A.; HASTIE, P.; MURRAY, J. A. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 88, p. 1–25, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102943>>.

GOMEZ, A.; SHARMA, A. K.; GREV, A.; SHEAFFER, C.; MARTINSON, K. The Horse Gut Microbiome Responds in a Highly Individualized Manner to Forage Lignification. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 96, p. 103306, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103306>>.

GRIMM, P.; COMBES, S.; PASCAL, G.; CAUQUIL, L.; JULLIAND, V. Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 4, p. 372–382, 2020.

GRIMM, P.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. **Animal**, v. 11, n. 7, p. 1136–1145, 2017.

HAMER, H. M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F. J.; BRUMMER, R. J. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104–119, 2008.

HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MOEN, B.; MÅGE, I.; RUDI, K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, p. 1–8, 2015.

HANSEN, N. C. K.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MÅGE, I.; RUDI, K. Molecular diversity of the equine caecal microbiota and its correlation to postprandial fermentation metabolites: A preliminary approach. **Acta Agriculturae**

**Scandinavica A: Animal Sciences**, v. 63, n. 4, p. 208–216, 2013.

HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; HAYES, S. H.; CRUM, A.; FLYTHE, M. D. Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–21, 2016.

HARRIS, P. A.; ELLIS, A. D.; FRADINHO, M. J.; JANSSON, A.; JULLIAND, V.; LUTHERSSON, N.; SANTOS, A. S.; VERVUERT, I. Review: Feeding conserved forage to horses: Recent advances and recommendations. **Animal**, v. 11, n. 6, p. 958–967, 2017.

HILLEBRANT, R. S.; DITTRICH, ; João Ricardo. ANATOMIA E FISIOLOGIA DO APARELHO DIGESTÓRIO DE EQUINOS APLICADAS AO MANEJO ALIMENTAR. **Revista Acadêmica de Ciência Equina**, v. 1, n. 2526– 513X, p. 16–22, 2015.

HOFFMAN, R. M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 270–276, 2009. Disponível em: <[www.sbz.org.br](http://www.sbz.org.br)>.

HUA, D.; HENDRIKS, W. H.; XIONG, B.; PELLIKAAN, W. F. Starch and Cellulose Degradation in the Rumen and Applications of Metagenomics on Ruminal Microorganisms. **Animals**, v. 12, n. 21, p. 1–13, 2022.

HUSE, S. M.; HUBER, J. A.; MORRISON, H. G.; SOGIN, M. L.; WELCH, D. M. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biology**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2007.

ILLUMINA. Understanding Illumina Quality Scores. **Technical Note: Informatics**, v. Pub. No. 7, p. 1–2, 2014. Disponível em: <[http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_understanding\\_quality\\_scores.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf)>.

JENSEN, R. B.; AUSTBØ, D.; BLACHE, D.; BACH KNUDSEN, K. E.; TAUSON, A. H. The effect of feeding barley or hay alone or in combination with molassed sugar beet pulp on the metabolic responses in plasma and caecum of horses. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 53–65, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.003>>.

JULLIAND, S.; MARTIN, A.; JULLIAND, V. Effect of dehydrated alfalfa on equine gastric and faecal microbial ecosystems. **Livestock Science**, v. 215, n. May, p. 16–20, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2017.05.005>>.

JULLIAND, V.; FOMBELLE, A. De; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. FEEDING AND MICROBIAL DISORDERS IN HORSES: PART 3—EFFECTS OF THREE HAY:GRAIN RATIOS ON MICROBIAL PROFILE AND ACTIVITIES. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 11, p. 543–546, 2001.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. Horse species symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 6, p.

2262–2274, 2016.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. The Impact of Diet on the Hindgut Microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 23–28, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.03.002>>.

KABE, A. M. G.; DE SOUZA, A. D.; DE MORO SOUSA, R. L.; DA SILVA BUENO, I. C.; MOTA, T. P.; CRANDELL, K.; VERVUERT, I.; CORREA, G. F.; BRANDI, R. A. Soybean Hulls in Equine Feed Concentrates: Apparent Nutrient Digestibility, Physicochemical and Microbial Characteristics of Equine Feces. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 36, p. 77–82, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.008>>.

KAUTER, A.; EPPING, L.; SEMMLER, T.; ANTAO, E.-M.; KANNAPIN, D.; STOECKLE, S. D.; GEHLEN, H.; LÜBKE-BECKER, A.; GÜNTHER, S.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2019.

KRISTOFFERSEN, C.; JENSEN, R. B.; AVERSHINA, E.; AUSTBØ, D.; TAUSON, A. H.; RUDI, K. Diet-dependent modular dynamic interactions of the equine cecal microbiota. **Microbes and Environments**, v. 31, n. 4, p. 378–386, 2016.

LEE, S. S.; HA, J. K. Relative Contributions of Bacteria , Protozoa , and Fungi to In Vitro Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. **Appl Environ Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 3807–3813, 2000.

LINDENBERG, F.; KRYCH, L.; FIELDEN, J.; KOT, W.; FRØKIÆR, H.; VAN GALEN, G.; NIELSEN, D. S.; HANSEN, A. K. Expression of immune regulatory genes correlate with the abundance of specific Clostridiales and Verrucomicrobia species in the equine ileum and cecum. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

MANLEY, L. J.; MA, D.; LEVINE, S. S. Monitoring error rates in Illumina sequencing. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 27, n. 4, p. 125–128, 2016.

MATOS, I. E. de; YAMASHITA, N. B.; NETO, I. M. C.; FRANCO, G. L. A FIBRA NA NUTRIÇÃO DE CAVALOS. **ANAIS DA X MOSTRA CIENTÍFICA FAMEZ / UFMS, CAMPO GRANDE**, v. 10, p. 176–183, 2017.

MATTOS, F.; ARAÚJO, K. V.; LEITE, G. G.; GOULART, H. de M. Uso de óleo na dieta de eqüinos submetidos ao exercício. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1373–1380, 2006.

MENEZES, M. L.; BRANDI, R. A.; BUENO, I. C. da S.; BALIEIRO, J. C. de C.; MOREIRA, C. G.; NASCIMENTO, O. C. de A. Effects of diets with increasing levels of citrus pulp on the blood parameters linked to energy metabolism in horses. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 6, p. 589–597, 2014.

MIRAGLIA, N.; BERGERO, D.; POLIDORI, M.; PEIRETTI, P. G.; LADETTO, G. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. **Livestock Science**, v. 100, n. 1, p. 10–13, 2006.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. Utilização de óleos em dietas para eqüinos (Use of oils in diets for horses). **Redvet**, n. 10, p. 121–136, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html>>.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. A Importância Eqüinos - La Alimentación de Carbohydrates for dos Carboidratos na Alimentação dos Importancia de los Carbohidratos en la los Equinos - The Importance of the Feeding Horses. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, v. IX, n. 1695–7504, p. 1–24, 2008.

MORGADO, E. S.; ALMEIDA, F. Q.; GODOI, F. N.; GOMES, A. V. C.; GALZERANO, L.; FRANÇA, A. B.; BRASILEIRO, L. S. Digestão de carboidratos em equinos alimentados com dietas compostas de volumoso ou de volumoso suplementado com concentrado e/ou óleo de soja. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1112–1119, 2009.

MORRISON, P. K.; NEWBOLD, C. J.; JONES, E.; WORGAN, H. J.; GROVE-WHITE, D. H.; DUGDALE, A. H.; BARFOOT, C.; HARRIS, P. A.; ARGO, C. M. G. The equine gastrointestinal microbiome: Impacts of age and obesity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, p. 1–13, 2018.

MOSS, P. C. B.; REZENDE, A. S. C.; SALIBA, E. O.; LANA, M. Q.; MOURA, R. S.; CASSOU, F.; COSTA, M. L. L.; FREITAS, G. P.; ALVES, G. E. S. Validação do Nanolipe® como método para determinar a digestibilidade aparente dos nutrientes pelos equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 687–694, 2017.

MUHONEN, S.; SADET-BOURGETEAU, S.; JULLIAND, V. Effects of differences in fibre composition and maturity of forage-based diets on the microbial ecosystem and its activity in equine caecum and colon digesta and faeces. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2021.

NASCIMENTO, J. C. dos S.; FILHO, L. B. da F.; PEREIRA, L. B. de S. Br.; SILVA, T. G. P.; ALBUQUERQUE, P. V. de; ANDRADE, G. P. de; ALCANTARA, Si. F. de; SILVA, R. L. A.; MELO, F. P. de; AMORIN, M. J. A. A. L. Utilização de óleos vegetais na alimentação de equinos : Revisão The use of vegetable oils in the feeding of horses : Review. **Pubvet**, v. 12, p. 1–7, 2018.

NEDJADI, T.; MORAN, A. W.; AL-RAMMAHI, M. A.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Characterization of butyrate transport across the luminal membranes of equine large intestine. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 10, p. 1335–1347, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of horses**. 6th rev. ed. Washington: National Academies Press, 2007.

OCHONSKI, P.; DOUTHIT, T.; DROUILLARD, J.; VAHL, C.; LATTIMER, J. Changes in cecal environment and forage intake of horses fed increasing amounts of starch. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 76, p. 70, 2019.

OCHONSKI, P.; DROUILLARD, J. S.; DOUTHIT, T. L.; VAHL, C.; LATTIMER, J. M. Caecal fermentation characteristics of commonly used feed ingredients. **Equine**



**Veterinary Journal**, v. 53, n. 5, p. 1056–1062, 2021.

OLIVEIRA, C. G. de; OLIVEIRA JÚNIOR, G. M. de; SILVA, R. M.; RODRIGUES, P. G.; BRITO, C. O.; SANTOS, T. S.; SOUZA, D. M. de; SILVA, C. M. Tempo de coleta para determinação dos coeficientes de digestibilidade de nutrientes em equinos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e1310212105, 2021.

OLIVEIRA, K. DE; SANTOS, V. P. DOS; COSTA, C.; FAUSTINO, M. G.; DE; CAROLINA, J.; SÁ; MEIRELLES; LIMA, P. R. DE. Parâmetros sanguíneos basais de cavalos submetidos à atividade aeróbica consumindo concentrados lipídicos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 69, p. 117–122, 2012.

PASSLACK, N.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. **Impact of Dietary Cellobiose on the Fecal Microbiota of Horses**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 911–30 p.

PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G. L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, p. 133–139, 2002.

RASPA, F.; VERVUERT, I.; CAPUCCHIO, M. T.; COLOMBINO, E.; BERGERO, D.; FORTE, C.; GREPPI, M.; CAVALLARIN, L.; GIRIBALDI, M.; ANTONIAZZI, S.; CAVALLINI, D.; VALVASSORI, E.; VALLE, E. A high-starch vs. high-fibre diet: effects on the gut environment of the different intestinal compartments of the horse digestive tract. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03289-2>>.

REED, K. J.; KUNZ, I. G. Z.; SCARE, J. A.; NIELSEN, M. K.; TURK, P. J.; COLEMAN, R. J.; COLEMAN, S. J. The pelvic flexure separates distinct microbial communities in the equine hindgut. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83783-z>>.

RESENDE JÚNIOR, T.; REZENDE, A. S. C.; LACERDA JÚNIOR, O. V.; BRETAS, M.; LANA, A.; MOURA, R. S.; RESENDE, H. C. Efeito do nível de óleo de milho adicionado à dieta de equinos sobre a digestibilidade dos nutrientes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 69–73, 2004.

RICHARDS, N.; HINCH, G. N.; ROWE, J. B. The effect of current grain feeding practices on hindgut starch fermentation and acidosis in the Australian racing Thoroughbred. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 11, p. 402–407, 2006.

SADET-BOURGETEAU, S.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Effect of concentrate feeding sequence on equine hindgut fermentation parameters. **Animal**, v. 11, n. 7, p. 1146–1152, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1751731116002603>>.

SANTOS, T. M. dos; ALMEIDA, F. Q. de; GODOI, F. N. de; SILVA, V. P.; FRANÇA, A. B.; SANTIAGO, J. M.; SANTOS, C. S. dos. Capacidade tamponante, pH e consistência das fezes em equinos submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1782–1788, 2009.

SANTOS, T. M. dos; ALMEIDA, F. Q. de; PIRES, M. S.; SANTIAGO, J. M.; ROIER,

- E. C. R.; GUEDES JÚNIOR, D. S.; NOGUEIRA, Y. A. C.; BRASILEIRO, L. S. Alterações clínicas e laboratoriais em equinos adaptados a dieta com nível elevado de concentrado e submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 116, 2011.
- SAS Institute Base SAS® 9.4 **Procedures Guide: Statistical Procedures**. 2nd ed. Cary, NC, USA: Editora SAS Institute Inc., 2013, 550 p.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SHEPHERD, M. L.; PONDER, M. A.; BURK, A. O.; MILTON, S. C.; SWECKER, W. S. Fibre digestibility, abundance of faecal bacteria and plasma acetate concentrations in overweight adult mares. **Journal of Nutritional Science**, v. 3, p. 1–11, 2014.
- SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q. de; MORGADO, E. da S.; FRANÇA, A. B.; VENTURA, H. T.; RODRIGUES, L. M. Digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos determinada pela técnica dos sacos móveis em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 1, p. 82–89, 2009.
- SORENSEN, R. J.; DROUILLARD, J. S.; DOUTHIT, T. L.; RAN, Q.; MARTHALER, D. G.; KANG, Q.; VAHL, C. I.; LATTIMER, J. M. Effect of hay type on cecal and fecal microbiome and fermentation parameters in horses. **Journal of animal science**, v. 99, n. 1, p. 1–10, 2021.
- SU, S.; ZHAO, Y.; LIU, Z.; LIU, G.; DU, M.; WU, J.; BAI, D.; LI, B.; BOU, G.; ZHANG, X.; DUGARJAVIIN, M. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments of Mongolian horses. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 6, p. 1085–1101, 2020.
- TEIXEIRA, J. C.; ANDRADE, G. Carboidratos na alimentação de ruminantes. **Simposio De Forragicultura E Pastagens**, v. 2, n. Figura 1, p. 165–210, 2001.  
Disponível em:  
<<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:CARBOIDRATOS+NA+ALIMENTAÇÃO+DE+RUMINANTES#0>>.
- THEELEN, M. J. P.; LUIKEN, R. E. C.; WAGENAAR, J. A.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; ROSSEN, J. W. A.; ZOMER, A. L. The equine faecal microbiota of healthy horses and ponies in the netherlands: Impact of host and environmental factors. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2021.
- URIBE DIAZ, A. D. P.; SANTANA, A. E.; ARAUJO VALADÃO, C. A.; DE SOUZA, A. H. Canulação Cecal Em Equinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 357–362, 2010.
- URSELL, L. K.; METCALF, J. L.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. Defining the

human microbiome. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. SUPPL. 1, 2012.

VERVUERT, I.; KLEIN, S.; COENEN, M. Short-term effects of a moderate fish oil or soybean oil supplementation on postprandial glucose and insulin responses in healthy horses. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 162–166, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.013>>.

VERVUERT, I.; VOIGT, K.; HOLLANDS, T.; CUDDEFORD, D.; COENEN, M. Effect of feeding increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in healthy horses. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 67–72, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.04.011>>.

VERVUERT, I. et al. Effects of processing barley on its digestion by horses. **Veterinary Record**, v. 162, n. 21, p. 684–688, 2008.

WARZECHA, C. M.; COVERDALE, J. A.; JANECKA, J. E.; LEATHERWOOD, J. L.; PINCHAK, W. E.; WICKERSHAM, T. A.; MCCANN, J. C. Influence of short-term dietary starch inclusion on the equine cecal microbiome. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 11, p. 5077–5090, 2017.

WEINERT-NELSON, J. R.; BIDDLE, A. S.; WILLIAMS, C. A. Fecal microbiome of horses transitioning between warm-season and cool-season grass pasture within integrated rotational grazing systems. **Animal Microbiome**, v. 4, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s42523-022-00192-x>>.

WEINERT, J. R.; BIDDLE, A. S.; WILLIAMS, C. A. 49 Exploring relationships between forage nutrients and the equine fecal microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 100, p. 103512, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103512>>.

WEISS, S.; XU, Z. Z.; PEDDADA, S.; AMIR, A.; BITTINGER, K.; GONZALEZ, A.; LOZUPONE, C.; ZANEVELD, J. R.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; BIRMINGHAM, A.; HYDE, E. R.; KNIGHT, R. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2017.

WILLIAMS, T.; RUDE, B.; LIAO, S.; MOCHAL-KING, C.; NICODEMUS, M. Effects of feeding fat on nutrient digestion in cannulated ponies fed a forage diet. **Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science**, v. 1, n. 3, p. 1–5, 2017.

WILLIAMS, T.; RUDE, B.; LIAO, S.; MOCHAL-KING, C.; NICODEMUS, M. Effects of fat supplementation on plasma glucose, insulin and fatty acid analysis in ponies maintained on a forage-based diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 4, p. 1069–1076, 2018.

WU, H. J.; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, 2012.

WU, Y.; YUE, X.; ZHOU, A.; SONG, X.; SU, B.; CAO, F.; DING, J. Chemosphere Simultaneous recovery of short-chain fatty acids and phosphorus during lipid-rich anaerobic fermentation with sodium hydroxide conditioning. **Chemosphere**, v. 312, n. P1, p. 137227, 2023. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137227>>.

WUNDERLICH, G.; BULL, M.; ROSS, T.; ROSE, M.; CHAPMAN, B. Understanding the microbial fibre degrading communities & processes in the equine gut. **Animal Microbiome**, v. 5, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s42523-022-00224-6>>.

YILMAZ, P.; PARFREY, L. W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; PRUESSE, E.; QUAST, C.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 643–648, 2014.

ZEYNER, A.; GEISLER, C.; DITTRICH, A. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 1–2, p. 7–19, 2004.

ZHU, Y.; WANG, X.; DENG, L.; CHEN, S.; ZHU, C.; LI, J. Effects of pasture grass, silage, and hay diet on equine fecal microbiota. **Animals**, v. 11, n. 5, 2021.

## **6 CONCLUSÃO**

A dieta a base de Fibra e óleo pode substituir a dieta açúcar e amido, por apresentar semelhantes valores de digestibilidade aparente, não alterar a concentração de AGCC no ceco, nas fezes e no sangue, não alterar o pH cecal e a quantificação de archaea e protozoários no ceco e nas fezes. A alteração da abundância da microbiota cecal e fecal e da diversidade fecal, não trazem prejuízos para a saúde e para o aproveitamento da dieta pelos equinos hípidos. As fezes não são representativas da população da microbiota do ceco.

## REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. A New look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, Piscataway, v. 19, n. 6, p. 716–723, 1974.

AL JASSIM, R. A. M.; ANDREWS, F. M. The Bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 199–215, 2009.

ARAÚJO, K. V.; DE FREITAS LIMA, J. A.; FIALHO, E. T.; MIYAGI, E. S. Comparação entre os indicadores internos e o método de coleta total na determinação da digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos, em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 745–751, 2000.

ARGENZIO, R. A.; SOUTHWORTH, M.; LOWE, J. E.; STEVENS, C. E. Interrelationship of Na, HCO<sub>3</sub>, and volatile fatty acid transport by equine large intestine. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism and Gastrointestinal Physiology**, Washington, v. 2, n. 6, p. E468-78, 1977.

ARROYO, L. G.; ROSSI, L.; SANTOS, B. P.; GOMEZ, D. E.; SURETTE, M. G.; COSTA, M. C. Luminal and mucosal microbiota of the cecum and large colon of healthy and diarrheic horses. **Animals**, Basel, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2020.

BELZECKI, G.; MILTKO, R.; MICHALOWSKI, T.; MCEWAN, N. R. Methods for the cultivation of ciliated protozoa Grzegorz Be l zecki. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 363, n. 2, art. fnv233, 2016.

BIDDLE, A. S.; BLACK, S. J.; BLANCHARD, J. L. An In vitro model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.

BRAGA, A. C.; ARAÚJO, K. V.; LEITE, G. G.; MASCARENHAS, A. G. Neutral detergent fiber levels in diet of equines. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 11, p. 1965–1972, 2008.

BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E. Importância nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. suppl. 1, p. 246–258, 2009.

BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E.; MARTINS, E. N.; VILLELA, E.; FREITAS, V.; QUEIROZ-NETO, A. De; LACERDA-NETO, J. C. De. Parâmetros bioquímicos de equinos submetidos à simulação de prova de enduro recebendo dietas com adição de óleo de soja Biochemical parameters of horses submitted to an endurance simulation receiving diets with soybean oil addition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 313–319, 2010.

BROKNER, C.; AUSTBO, D.; NÆSSET, J. A.; BLACHE, D.; BACH KNUDSEN, K.

E.; TAUSON, A. H. Metabolic response to dietary fibre composition in horses. **Animal**, Cambridge, v. 10, n. 7, p. 1155–1163, 2016.

BUSHNELL, B.; ROOD, J.; SINGER, E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2017.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, New York, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CERBARO, A. E. M.; GONÇALVES, R. N.; LEMES, J. S.; PIEREZAN, M.; LUNKES, V. L.; VAZ, R. Z. Óleo vegetal na dieta de equinos submetidos a exercício. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 9, n. 2525–3409, p. 2–12, 23 ago. 2020.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; SACY, A.; KARGES, K.; APPER, E. Gastro-Intestinal microbiota in equines and its role in health and disease: the black box opens. **Microorganisms**, Basel, v. 10, n. 12, p. 1–33, 2022.

COLLINET, A.; GRIMM, P.; JULLIAND, S.; JULLIAND, V. Sequential modulation of the equine fecal microbiota and fibrolytic capacity following two consecutive abrupt dietary changes and bacterial supplementation. **Animals**, Basel, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2021.

CORREA, G. F.; NASCIMENTO, O. C. A.; MOTA, T. P.; HESPANHOLO, G. O.; MOREIRA, C. G.; MENEZES, M. L.; VERVUERT, I.; BALIEIRO, J. C. C.; BUENO, I. C. S.; BRANDI, R. A. Impact on digestibility, and blood and fecal parameters of replacing wheat bran with corn gluten meal in concentrate of adult horses. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 186, p. 41–45, 2016. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.06.001.

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE, J. S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16s rRNA gene. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 7, art. e41484, 2012.

COSTA, M. C.; SILVA, G.; RAMOS, R. V.; STAEMPFLI, H. R.; ARROYO, L. G.; KIM, P.; WEESE, J. S. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. **Veterinary Journal**, London, v. 205, n. 1, p. 74–80, 2015. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.03.018.

COSTA, M. C.; WEESE, J. S. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 1–12, 2018.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 572–582, Dec. 2006. DOI: /10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x.

DIREKVANDI, E.; KALANTARI, R. K. Fecal volatile fatty acids and blood

metabolites in the turkmen horse associated with type and source of cereal grains. **Journal of Applied Animal Research**, Abingdon, v. 46, n. 1, p. 1078–1083, 2018.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; GEOR, R. J.; NIELSEN, B. D.; SCHOTT, H. C.; ELZINGA, S.; JAMIE NEWBOLD, C. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, art. e87424, p. 1–9, 2014.

DOUGAL, K.; DE LA FUENTE, G.; HARRIS, P. A.; GIRDWOOD, S. E.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 10, art. e77660, p. 1–12, 2013.

DOUGAL, K.; HARRIS, P. A.; EDWARDS, A.; PACHEBAT, J. A.; BLACKMORE, T. M.; WORGAN, H. J.; NEWBOLD, C. J. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 642–652, 2012.

DROGOUL, C.; DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: Effect of three hay:grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 21, n. 10, p. 487–491, 2001.

DUNNETT, C. E.; MARLIN, D. J.; HARRIS, R. C. Effect of dietary lipid on response to exercise : relationship to metabolic adaptation. **Equine Veterinary Journal. Supplement**, Newmarket, v. 34, p. 75–80, 2002.

EDWARDS, J. E.; SHETTY, S. A.; VAN DEN BERG, P.; BURDEN, F.; VAN DOORN, D. A.; PELLIKAAN, W. F.; DIJKSTRA, J.; SMIDT, H. Multi-kingdom characterization of the core equine fecal microbiota based on multiple equine (sub)species. **Animal Microbiome**, London, v. 2, n. 1, art. 6, 2020. DOI: 10.1186/s42523-020-0023-1.

ELZINGA, S. E.; WEESE, J. S.; ADAMS, A. A. Comparison of the fecal microbiota in horses with equine metabolic syndrome and metabolically normal controls fed a similar all-forage diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 44, p. 9–16, 2016. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.05.010.

EVERARD, A.; BELZER, C.; GEURTS, L.; OUWERKERK, J. P.; DRUART, C.; BINDELS, L. B.; GUIOT, Y.; DERRIEN, M.; MUCCIOLI, G. G.; DELZENNE, N. M.; DE VOS, W. M.; CANI, P. D. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.

FEN, Y.; EDWARDS, J. E.; ALLISON, G. G.; ZHU, W.; THEODOROU, M. K. Bioresource Technology Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 20, p. 4821–4828, 2009. DOI:



10.1016/j.biortech.2009.04.031.

FERNANDES, K. A.; KITTELMANN, S.; ROGERS, C. W.; GEE, E. K.; BOLWELL, C. F.; BERMINGHAM, E. N.; THOMAS, D. G. Faecal microbiota of forage-fed horses in new zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 11, art. e112846, 2014.

FRAPE, D. **Equine nutrition and feeding**. 3rd ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2004. 650 p.

GARBER, A.; HASTIE, P.; MURRAY, J. A. Factors influencing equine gut microbiota: current knowledge. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 88, p. 1–25, 2020. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.102943. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.102943.

GOMEZ, A.; SHARMA, A. K.; GREV, A.; SHEAFFER, C.; MARTINSON, K. The Horse Gut Microbiome Responds in a Highly Individualized Manner to Forage Lignification. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 96, p. 103306, 2021. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103306. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103306.

GRIMM, P.; COMBES, S.; PASCAL, G.; CAUQUIL, L.; JULLIAND, V. Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 123, n. 4, p. 372–382, 2020.

GRIMM, P.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. **Animal**, Cambridge, v. 11, n. 7, p. 1136–1145, 2017.

HAMER, H. M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F. J.; BRUMMER, R. J. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 104–119, 2008.

HANSEN, N. C. K.; AVERSHINA, E.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MOEN, B.; MÅGE, I.; RUDI, K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. **Microbial Ecology in Health & Disease**, Chichester, v. 26, art. 27216, p. 1–8, 2015.

HANSEN, N. C. K.; MYDLAND, L. T.; NÆSSET, J. A.; AUSTBØ, D.; MÅGE, I.; RUDI, K. Molecular diversity of the equine caecal microbiota and its correlation to postprandial fermentation metabolites: A preliminary approach. **Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences**, Copenhagen, v. 63, n. 4, p. 208–216, 2013.

HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; HAYES, S. H.; CRUM, A.; FLYTHE, M. D. Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 4, art. e0154037, p. 1–21, 2016.

HARRIS, P. A.; ELLIS, A. D.; FRADINHO, M. J.; JANSSON, A.; JULLIAND, V.; LUTHERSSON, N.; SANTOS, A. S.; VERVUERT, I. Review: Feeding conserved forage to horses: Recent advances and recommendations. **Animal**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 958–967, 2017.

HILLEBRANT, R. S.; DITTRICH, J. R. Anatomia e fisiologia do aparelho digestório de equinos aplicadas ao manejo alimentar. **Revista Acadêmica de Ciência Equina**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2015.

HOFFMAN, R. M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 270–276, 2009.

HUA, D.; HENDRIKS, W. H.; XIONG, B.; PELLIKAAN, W. F. Starch and cellulose degradation in the rumen and applications of metagenomics on ruminal microorganisms. **Animals**, Basel, v. 12, n. 21, p. 1–13, 2022.

HUSE, S. M.; HUBER, J. A.; MORRISON, H. G.; SOGIN, M. L.; WELCH, D. M. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 7, art. R143, p. 1–9, 2007.

ILLUMINA. Understanding illumina quality scores. **Illumina**, n.770-2010, 2014. (Technical Note: Informatics). Disponível em: [http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_understanding\\_quality\\_scores.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf). Acesso em: 23 mar. 2023.

JENSEN, R. B.; AUSTBØ, D.; BLACHE, D.; BACH KNUDSEN, K. E.; TAUSON, A. H. The effect of feeding barley or hay alone or in combination with molassed sugar beet pulp on the metabolic responses in plasma and caecum of horses. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 214, p. 53–65, 2016. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2016.02.003. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2016.02.003.

JULLIAND, S.; MARTIN, A.; JULLIAND, V. Effect of dehydrated alfalfa on equine gastric and faecal microbial ecosystems. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 215, p. 16–20, 2018. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.05.005. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.05.005.

JULLIAND, V.; FOMBELLE, A. De; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: part 3 - effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 21, n. 11, p. 543–546, 2001.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. Horse species symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 94, n. 6, p. 2262–2274, 2016. DOI: 10.1016/j.jevs.2017.03.002.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. The Impact of diet on the hindgut microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 52, p. 23–28, 2017. DOI: 10.1016/j.jevs.2017.03.002.

KABE, A. M. G.; DE SOUZA, A. D.; DE MORO SOUSA, R. L.; DA SILVA BUENO, I. C.; MOTA, T. P.; CRANDELL, K.; VERVUERT, I.; CORREA, G. F.; BRANDI, R. A. Soybean hulls in equine feed concentrates: apparent nutrient digestibility, physicochemical and microbial characteristics of equine feces. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 36, p. 77–82, 2016. DOI: 10.1016/j.jevs.2015.10.008.

KAUTER, A.; EPPING, L.; SEMMLER, T.; ANTAO, E.-M.; KANNAPIN, D.; STOECKLE, S. D.; GEHLEN, H.; LÜBKE-BECKER, A.; GÜNTHER, S.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. **Animal Microbiome**, London, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2019.

KRISTOFFERSEN, C.; JENSEN, R. B.; AVERSHINA, E.; AUSTBØ, D.; TAUSON, A. H.; RUDI, K. Diet-dependent modular dynamic interactions of the equine cecal microbiota. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 31, n. 4, p. 378–386, 2016.

LEE, S. S.; HA, J. K. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3807–3813, 2000.

LINDENBERG, F.; KRYCH, L.; FIELDEN, J.; KOT, W.; FRØKLÆR, H.; VAN GALEN, G.; NIELSEN, D. S.; HANSEN, A. K. Expression of immune regulatory genes correlate with the abundance of specific Clostridiales and Verrucomicrobia species in the equine ileum and cecum. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

MANLEY, L. J.; MA, D.; LEVINE, S. S. Monitoring error rates in Illumina sequencing. **Journal of Biomolecular Techniques**, Santa Fe, v. 27, n. 4, p. 125–128, 2016.

MATOS, I. E.; YAMASHITA, N. B.; NETO, I. M. C.; FRANCO, G. L. A fibra na nutrição de cavalos. *In*: MOSTRA CIENTÍFICA FAMEZ/UFMS, 10., 2017, Campo Grande. **Anais [...]**. Campo Grande, 2017. v. 10, p. 176–183.

MATTOS, F.; ARAÚJO, K. V.; LEITE, G. G.; GOULART, H. de M. Uso de óleo na dieta de eqüinos submetidos ao exercício. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1373–1380, 2006.

MENEZES, M. L.; BRANDI, R. A.; BUENO, I. C. S.; BALIEIRO, J. C. C.; MOREIRA, C. G.; NASCIMENTO, O. C. A. Effects of diets with increasing levels of citrus pulp on the blood parameters linked to energy metabolism in horses. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 6, p. 589–597, 2014.

MIRAGLIA, N.; BERGERO, D.; POLIDORI, M.; PEIRETTI, P. G.; LADETTO, G. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 10–13, 2006.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. Utilização de óleos em dietas para eqüinos. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, Málaga, v. 7, n. 10, p. 121–136, 2006.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. A Importância dos carboidratos na alimentação dos eqüinos. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, Málaga, v. 9, n. 1695–7504, p. 1–24, 2008.

MORGADO, E. S.; ALMEIDA, F. Q.; GODOI, F. N.; GOMES, A. V. C.;

GALZERANO, L.; FRANÇA, A. B.; BRASILEIRO, L. S. Digestão de carboidratos em equinos alimentados com dietas compostas de volumoso ou de volumoso suplementado com concentrado e/ou óleo de soja. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1112–1119, 2009.

MORRISON, P. K.; NEWBOLD, C. J.; JONES, E.; WORGAN, H. J.; GROVE-WHITE, D. H.; DUGDALE, A. H.; BARFOOT, C.; HARRIS, P. A.; ARGO, C. M. G. The equine gastrointestinal microbiome: impacts of age and obesity. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, art. 3017, p. 1–13, 2018.

MOSS, P. C. B.; REZENDE, A. S. C.; SALIBA, E. O.; LANA, M. Q.; MOURA, R. S.; CASSOU, F.; COSTA, M. L. L.; FREITAS, G. P.; ALVES, G. E. S. Validação do Nanolipe® como método para determinar a digestibilidade aparente dos nutrientes pelos equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 3, p. 687–694, 2017.

MUHONEN, S.; SADET-BOURGETEAU, S.; JULLIAND, V. Effects of differences in fibre composition and maturity of forage-based diets on the microbial ecosystem and its activity in equine caecum and colon digesta and faeces. **Animals**, Basel, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2021.

NASCIMENTO, J. C. S.; FONSECA FILHO, L. B.; PEREIRA, L. B. S. B.; SILVA, T. G. P.; ALBUQUERQUE, P. V.; ANDRADE, G. P.; ALCANTARA, S. F.; SILVA, R. L. A.; MELO, F. P.; ACCIOLY, M. J. A.; AMORIN, L. Utilização de óleos vegetais na alimentação de equinos: revisão. **Pubvet**, Maringá, v. 12, n. 3, art. 57, p. 1–7, 2018.

NEDJADI, T.; MORAN, A. W.; AL-RAMMAHI, M. A.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Characterization of butyrate transport across the luminal membranes of equine large intestine. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 99, n. 10, p. 1335–1347, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of horses**. 6th rev. ed. Washington: National Academies Press, 2007.

OCHONSKI, P.; DOUTHIT, T.; DROUILLARD, J.; VAHL, C.; LATTIMER, J. Changes in cecal environment and forage intake of horses fed increasing amounts of starch. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 76, p. 70, 2019.

OCHONSKI, P.; DROUILLARD, J. S.; DOUTHIT, T. L.; VAHL, C.; LATTIMER, J. M. Caecal fermentation characteristics of commonly used feed ingredients. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 53, n. 5, p. 1056–1062, 2021.

OLIVEIRA, C. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, G. M.; SILVA, R. M.; RODRIGUES, P. G.; BRITO, C. O.; SANTOS, T. S.; SOUZA, D. M.; SILVA, C. M. Tempo de coleta para determinação dos coeficientes de digestibilidade de nutrientes em equinos. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 2, p. e1310212105, 2021.

OLIVEIRA, K.; SANTOS, V. P.; COSTA, C.; FAUSTINO, M. G.; CAROLINA, J.; SÁ; MEIRELLES; LIMA, P. R. Parâmetros sanguíneos basais de cavalos submetidos à atividade aeróbica consumindo concentrados lipídicos. **Boletim de Indústria Animal**, Noda Odessa, v. 69, p. 117–122, 2012.

PABSLACK, N.; VAHJEN, W.; ZENTEK, J. Impact of dietary cellobiose on the fecal microbiota of horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 91, art. 103106, 2020.

PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G. L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, n. 2, p. 133–139, 2002.

RASPA, F.; VERVUERT, I.; CAPUCCHIO, M. T.; COLOMBINO, E.; BERGERO, D.; FORTE, C.; GREPPI, M.; CAVALLARIN, L.; GIRIBALDI, M.; ANTONIAZZI, S.; CAVALLINI, D.; VALVASSORI, E.; VALLE, E. A high-starch vs. high-fibre diet: effects on the gut environment of the different intestinal compartments of the horse digestive tract. **BMC Veterinary Research**, London, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1186/s12917-022-03289-2.

REED, K. J.; KUNZ, I. G. Z.; SCARE, J. A.; NIELSEN, M. K.; TURK, P. J.; COLEMAN, R. J.; COLEMAN, S. J. The pelvic flexure separates distinct microbial communities in the equine hindgut. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-83783-z.

RESENDE JÚNIOR, T.; REZENDE, A. S. C.; LACERDA JÚNIOR, O. V.; BRETAS, M.; LANA, A.; MOURA, R. S.; RESENDE, H. C. Efeito do nível de óleo de milho adicionado à dieta de equinos sobre a digestibilidade dos nutrientes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Viçosa, v. 56, n. 1, p. 69–73, 2004.

RICHARDS, N.; HINCH, G. N.; ROWE, J. B. The effect of current grain feeding practices on hindgut starch fermentation and acidosis in the Australian racing Thoroughbred. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 84, n. 11, p. 402–407, 2006.

SADET-BOURGETEAU, S.; PHILIPPEAU, C.; JULLIAND, V. Effect of concentrate feeding sequence on equine hindgut fermentation parameters. **Animal**, Cambridge, v. 11, n. 7, p. 1146–1152, 2017. DOI: 10.1017/S1751731116002603.

SANTOS, T. M.; ALMEIDA, F. Q.; GODOI, F. N.; SILVA, V. P.; FRANÇA, A. B.; SANTIAGO, J. M.; SANTOS, C. S. Capacidade tamponante, pH e consistência das fezes em equinos submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1782–1788, 2009.

SANTOS, T. M.; ALMEIDA, F. Q.; PIRES, M. S.; SANTIAGO, J. M.; ROIER, E. C. R.; GUEDES JÚNIOR, D. S.; NOGUEIRA, Y. A. C.; BRASILEIRO, L. S. Alterações clínicas e laboratoriais em equinos adaptados a dieta com nível elevado de concentrado e submetidos à sobrecarga dietética com amido. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 116, 2011.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-

supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SHEPHERD, M. L.; PONDER, M. A.; BURK, A. O.; MILTON, S. C.; SWECKER, W. S. Fibre digestibility, abundance of faecal bacteria and plasma acetate concentrations in overweight adult mares. **Journal of Nutritional Science**, Cambridge, v. 3, art. e10, p. 1–11, 2014.

SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q.; MORGADO, E. S.; FRANÇA, A. B.; VENTURA, H. T.; RODRIGUES, L. M. Digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos determinada pela técnica dos sacos móveis em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 82–89, 2009.

SORENSEN, R. J.; DROUILLARD, J. S.; DOUTHIT, T. L.; RAN, Q.; MARTHALER, D. G.; KANG, Q.; VAHL, C. I.; LATTIMER, J. M. Effect of hay type on cecal and fecal microbiome and fermentation parameters in horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 99, n. 1, p. 1–10, 2021.

SU, S.; ZHAO, Y.; LIU, Z.; LIU, G.; DU, M.; WU, J.; BAI, D.; LI, B.; BOU, G.; ZHANG, X.; DUGARJAVIIN, M. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments of Mongolian horses. **MicrobiologyOpen**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 1085–1101, 2020.

TEIXEIRA, J. C.; ANDRADE, G. Carboidratos na alimentação de ruminantes. *In*: SIMPOSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 2., 2001, Lavras. **Anais [...]**. Lavras: Editora UFLA, 2001. p. 165–210.

THEELEN, M. J. P.; LUIKEN, R. E. C.; WAGENAAR, J. A.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; ROSSEN, J. W. A.; ZOMER, A. L. The equine faecal microbiota of healthy horses and ponies in the netherlands: Impact of host and environmental factors. **Animals**, Basel, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2021.

URIBE DIAZ, A. D. P.; SANTANA, A. E.; ARAUJO VALADÃO, C. A.; DE SOUZA, A. H. Canulação Cecal Em Equinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 357–362, 2010.

URSELL, L. K.; METCALF, J. L.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. Defining the human microbiome. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 70, n. suppl. 1, p. S37-S44, 2012.

VERVUERT, I.; KLEIN, S.; COENEN, M. Short-term effects of a moderate fish oil or soybean oil supplementation on postprandial glucose and insulin responses in healthy horses. **The Veterinary Journal**, London, v. 184, n. 2, p. 162–166, 2010. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.01.013.

VERVUERT, I.; VOIGT, K.; HOLLANDS, T.; CUDDEFORD, D.; COENEN, M. Effect of feeding increasing quantities of starch on glycaemic and insulinaemic responses in healthy horses. **Veterinary Journal**, London, v. 182, n. 1, p. 67–72, 2009. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.04.011.

VERVUERT, I.; VOIGT, K.; HOLLANDS, T.; CUDDEFORD, D.; COENEN, M. Effects of processing barley on its digestion by horses. **Pferdeheilkunde**, v. 24, n. 5, p. 720, 2008.

WARZECHA, C. M.; COVERDALE, J. A.; JANECKA, J. E.; LEATHERWOOD, J. L.; PINCHAK, W. E.; WICKERSHAM, T. A.; MCCANN, J. C. Influence of short-term dietary starch inclusion on the equine cecal microbiome. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 95, n. 11, p. 5077–5090, 2017.

WEINERT-NELSON, J. R.; BIDDLE, A. S.; WILLIAMS, C. A. Fecal microbiome of horses transitioning between warm-season and cool-season grass pasture within integrated rotational grazing systems. **Animal Microbiome**, London, v. 4, n. 1, art. 41, 2022. DOI: 10.1186/s42523-022-00192-x.

WEINERT, J. R.; BIDDLE, A. S.; WILLIAMS, C. A. 49 Exploring relationships between forage nutrients and the equine fecal microbiome. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 100, p. 103512, 2021. DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103512.

WEISS, S.; XU, Z. Z.; PEDDADA, S.; AMIR, A.; BITTINGER, K.; GONZALEZ, A.; LOZUPONE, C.; ZANEVELD, J. R.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; BIRMINGHAM, A.; HYDE, E. R.; KNIGHT, R. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, London, v. 5, n. 1, art. 27, p. 1–18, 2017.

WILLIAMS, T.; RUDE, B.; LIAO, S.; MOCHAL-KING, C.; NICODEMUS, M. Effects of feeding fat on nutrient digestion in cannulated ponies fed a forage diet. **Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 1–5, 2017.

WILLIAMS, T.; RUDE, B.; LIAO, S.; MOCHAL-KING, C.; NICODEMUS, M. Effects of fat supplementation on plasma glucose, insulin and fatty acid analysis in ponies maintained on a forage-based diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 1069-1076, 2018.

WU, H. J.; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, Austin, v. 3, n. 1, p. 4-14, 2012.

WU, Y.; YUE, X.; ZHOU, A.; SONG, X.; SU, B.; CAO, F.; DING, J. Chemosphere Simultaneous recovery of short-chain fatty acids and phosphorus during lipid-rich anaerobic fermentation with sodium hydroxide conditioning. **Chemosphere**, Oxford, v. 312, n. Pt. 1, art. 137227, 2023. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.137227.

WUNDERLICH, G.; BULL, M.; ROSS, T.; ROSE, M.; CHAPMAN, B. Understanding the microbial fibre degrading communities & processes in the equine gut. **Animal Microbiome**, London, v. 5, n. 1, art. 3, 2023. DOI: 10.1186/s42523-022-00224-6.

YILMAZ, P.; PARFREY, L. W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; PRUESSE, E.; QUAST, C.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, n. D1, p. 643–648, 2014.

ZEYNER, A.; GEISLER, C.; DITTRICH, A. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 88, n. 1-2, p. 7-19, 2004.

ZHU, Y.; WANG, X.; DENG, L.; CHEN, S.; ZHU, C.; LI, J. Effects of pasture grass, silage, and hay diet on equine fecal microbiota. **Animals**, Basel, v. 11, n. 5, art. 1330, 2021.