

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

OLIGOSSACARÍDEOS COM AÇÃO PREBIÓTICA EM GATOS ADULTOS

Autora: Isabela de Oliveira Martins
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza

MARINGÁ
Estado do Paraná
Agosto – 2022

OLIGOSSACARÍDEOS COM AÇÃO PREBIÓTICA EM GATOS ADULTOS

Autora: Isabela de Oliveira Martins

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
Agosto – 2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M386o

Martins, Isabela Oliveira

Oligossacarídeos com ação prebiótica em gatos adultos / Isabela Oliveira Martins. --
Maringá, PR, 2023.

56 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.

Coorientadora: Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências
Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2023.

1. Nutrição animal. 2. Saúde intestinal. 3. Microbiota intestinal . 4. Prebióticos . 5. Gatos
- Alimentação. I. Vasconcellos, Ricardo Souza , orient. II. Pozza, Magali Soares dos Santos
, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.085



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

OLIGOSSACARÍDEOS COM AÇÃO PREBIÓTICA
EM GATOS ADULTOS

Autora: Isabela de Oliveira Martins
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 02 de setembro de 2022.

Prof.^a Dr.^a Ananda Portela Felix

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu
Filho

Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Orientador

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todos os dias, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Baleki

Aos meus pais, Alexandra e Marco Aurélio. Às minhas avós, Margarida e Alaerce, que me incentivaram e me apoiaram nessa minha jornada.

Aos meus irmãos, Leonardo de Oliveira Martins e Pedro Lemes da Silva Neto, por todo carinho e companheirismo.

E às minhas queridas amigas Alina, Flávia e Anna Beatriz, por toda ajuda e suporte durante essa fase da minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Departamento de Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Ricardo Souza Vasconcellos e à Professora Dra. Magali Soares dos Santos, por toda orientação, ensinamentos, estímulo e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), por toda a ajuda na realização deste trabalho a nível de campo.

Ao grupo CEENUFEL, pela ajuda e auxílio durante o período experimental.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), Osvaldo e Ulisses, pela ajuda e apoio na condução das análises químicas.

E, aos que não foram citados, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desta etapa e estão no meu coração.

Meus sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

ISABELA DE OLIVEIRA MARTINS, filha de Marco Aurélio Benati Martins e Alexandra Mara de Oliveira, nasceu em Cruzeiro do Sul, Paraná, no dia 29 de junho de 1996. Em fevereiro de 2014, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Durante sua graduação, participou de projetos de iniciação científica e foi membro do grupo PET (Programa de Ensino Tutorial). Em fevereiro de 2019, obteve o título de “Zootecnista” pela mesma instituição. No mesmo ano, ingressou no programa de pós-graduação em Zootecnia, como aluna não-regular, onde nesse período ajudou com as atividades do grupo de pesquisa CEENUFEL. No ano de 2020, ingressou como aluna regular no programa de pós-graduação em Zootecnia, onde iniciou os estudos e o projeto de pesquisa. E em Setembro de 2022, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DE LITERATURA	13
1. PREBIÓTICOS	13
1.1. FRUTOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	15
1.2. INULINA.....	16
1.3. GALACTOLISSACARÍDEO (GOS).....	17
2. MICROBIOTA INTESTINAL	17
3. PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E SAÚDE INTESTINAL.....	19
4. SISTEMA IMUNE.....	20
REFERÊNCIAS	21
II. Uso de oligossacarídeos na dieta de gatos adultos e avaliação dos efeitos na digestibilidade aparente, qualidade fecal e microbiota intestinal.....	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.	33
Tabela 2. Composição química analisada das dietas experimentais.	34
Tabela 3. Consumo de energia metabolizável, coeficientes de digestibilidade e energia metabolizável das dietas e pH urinários dos gatos consumindo dietas contendo prebiótico.	40
Tabela 4. Médias dos parâmetros fermentativos fecais, escore e matéria seca dos animais dos tratamentos Controle Negativo ou contendo prebióticos.	41
Tabela 5. Médias das relativas concentrações dos principais filos bacterianos presentes nas fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.	45
Tabela 6. Filo predominante e gênero bacteriano (expresso como porcentagem média do total de sequências) das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.	46
Tabela 7. Monócitos e granulócitos fagocitados e leucócitos totais ex vivo, após 3 semanas dos gatos receberem as dietas experimentais.	47
Tabela 8. Concentração de IgA fecal nos gatos alimentados com as dietas experimentais.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Correlação Canônica para os parâmetros fermentativos e de qualidade fecal entre as dietas experimentais.	42
Figura 2. Taxonomia, categoria Filo, das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.....	43
Figura 3. Taxonomia, categoria Família, das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.....	44
Figura 4. Taxonomia, categoria Gênero, das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.....	45

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente, as características fecais, modulação da microbiota e parâmetros imunológicos de gatos alimentados com dietas com a inclusão de frutoligossacarídeo (FOS), galactoligossacarídeo (GOS) e inulina. Foram formuladas seis dietas: 1 - controle negativo (CN), sem inclusão de prebióticos; 2 e 3 – CN com a inclusão de 0,8% de FOS (foram utilizados dois FOS, denominados FOS₁ e FOS₂, com diferentes composições), 4 – CN com inclusão de 0,8% de GOS, 5 – CN com a inclusão de 0,8% de inulina e 6 – CN com a inclusão de 0,8% de FOS₁ + inulina. Cada dieta foi oferecida para seis gatos adultos (n=6), totalizando 36 gatos, em um delineamento em blocos casualizados no tempo. Para os produtos finais de fermentação intestinal, foi utilizada a análise estatística multivariada (MANOVA) e a análise de correlações canônicas entre estes com os tratamentos. A microbiota intestinal foi comparada por estatística não-paramétrica. Não foi observada diferença significativa para os tratamentos, em relação aos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA). Houve efeito significativo para tratamento (p=0,02235), em relação aos produtos de fermentação, onde os tratamentos com FOS e GOS apresentaram aumento para formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de cadeia ramificada (AGCR). A microbiota dos animais não foi modificada durante o período de estudo, porém, observou-se uma maior diversidade bacteriana para o tratamento com a inclusão do GOS. No presente estudo, pode-se concluir, que a inclusão de prebióticos não alterou os CDAs, porém, aumenta a produção de produtos finais de fermentação e pode-se observar uma maior diversidade de diferentes microrganismos para o tratamento com GOS, apresentando este prebiótico potencial de uso para a espécie.

Palavras-chaves: carboidratos não-digeríveis, AGCC, produtos de fermentação, modulação, microbiota intestinal, sistema imune.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the apparent digestibility coefficients, fecal characteristics, microbiota modulation and immunological parameters of cats fed diets with the inclusion of fructooligosaccharide (FOS), galactooligosaccharide (GOS) and inulin. Six diets were formulated: 1 - negative control (NC), without the inclusion of prebiotics; 2 and 3 – CN with the inclusion of 0.8% of FOS (two FOS, called FOS1 and FOS2, with different compositions were used), 4 – CN with the inclusion of 0.8% of GOS, 5 – CN with the inclusion of 0.8% of inulin and 6 – CN with the inclusion of 0.8% of FOS1 + inulin. Each diet was offered to six adult cats (n=6), totaling 36 cats, in a randomized block design. For the final products of intestinal fermentation, multivariate statistical analysis (MANOVA) and the analysis of canonical correlations between these and the treatments were used. The intestinal microbiota was compared by non-parametric statistics. No significant difference was observed for the treatments in relation to the apparent digestibility coefficients (ADC). There was a significant effect for treatment (p=0.02235) in relation to fermentation products, where treatments with FOS and GOS showed an increase in the formation of short-chain (SCFA) and branched-chain (AGCR) fatty acids. The microbiota of the animals was not modified during the study period, but a greater bacterial diversity was observed for the treatment with the inclusion of GOS. In the present study, it can be concluded that the inclusion of prebiotics did not change the CDAs, but it increases the production of fermentation end products and a greater diversity of different microorganisms can be observed for the treatment with GOS, presenting this prebiotic potential use the species.

Keywords: non-digestible carbohydrates, SCFA, fermentation products, modulation, gut microbiota, immune system.

INTRODUÇÃO

Animais de companhia, como cães e gatos, possuem uma grande importância afetiva aos seres humanos, com isso, é importante o desenvolvimento de produtos que beneficiam a saúde desse animal, promovendo melhor qualidade e expectativa de vida (Baffoni, 2017). A nutrição é um dos principais meios para garantir a promoção da saúde e bem-estar dos animais. Estudos mostram que a inclusão de alguns ingredientes nas dietas possui efeitos benéficos para saúde dos mesmos (De Godoy *et al.*, 2013).

Com a atual expansão do mercado pet em busca de alimentos com maior valor agregado, melhor balanceados e à base de ingredientes de alta qualidade, o uso de prebióticos tem sido explorado devido aos seus benefícios para a microbiota nativa dos animais e o estímulo para a predominância de determinados grupos de bactérias benéficas no trato gastrointestinal (Jugan, *et al.*, 2017). Essas bactérias apresentam vias metabólicas dominantes que levam à formação de compostos benéficos à saúde intestinal e imunidade do hospedeiro, tais como ácidos graxos de cadeia curta. Os efeitos benéficos podem ser relacionados com seu metabolismo, como os perfis de fermentação e produtos finais, capacidade de produção de vitaminas e defesa contra agentes potencialmente prejudiciais (Deng e Swanson, 2015).

O lúmen intestinal possui um conjunto complexo e dinâmico de microrganismos, denominado microbiota intestinal (Hamer *et al.*, 2011). A microbiota intestinal desempenha um papel importante na fisiologia do intestino, sendo responsável por funções como metabolização dos nutrientes que não foram absorvidos e seus metabólitos produzidos podem auxiliar na prevenção da colonização por potenciais patógenos.

Prebióticos são definidos como alimentos não-digeríveis e seletivamente fermentados, estimulando o crescimento e atividade de grupos específicos de bactérias que compõem a microbiota intestinal. Esses alimentos estão diretamente relacionados às alterações no trato gastrointestinal que induzem no animal (Venter, 2007).

O principal grupo de prebióticos são os oligossacarídeos, como frutoligossacarídeos (FOS), insulina e galactoligossacarídeos (GOS). Esses oligossacarídeos são utilizados como substrato para as bactérias, estimulando a modulação da microbiota, efeitos positivos na digestibilidade aparentes dos nutrientes e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Schimtz & Suchodolski, 2016).

A fermentação pode ter consequências positivas e negativas na funcionalidade intestinal do animal e isso está relacionado com o tipo de substrato que será fermentado pela microbiota. Por exemplo, sabe-se que a fermentação de carboidratos leva à produção principalmente de ácidos graxos de cadeia curta, os quais favorecem o desenvolvimento de bactérias lácticas benéficas ao intestino (Barry *et al.*, 2010). No entanto, o aumento no fluxo de resíduos de aminoácidos que chegam ao intestino pode gerar compostos potencialmente tóxicos, como amônia, aminas biogênicas, ácidos graxos de cadeia ramificada, fenóis e indóis (Swanson *et al.*, 2002). De modo direto, é possível quantificar produtos finais de fermentação no intestino, através da avaliação das características fecais dos animais. Os produtos finais de fermentação podem ser sinalizadores sobre a funcionalidade intestinal.

Visando a importância de uma dieta que não só atenda a exigência nutricional para manutenção do animal, mas que possa oferecer efeitos benéficos para a saúde em geral, objetivou-se através desse estudo a avaliação das características fecais, assim como a produção de produtos finais de fermentação e a modulação da microbiota intestinal em gatos alimentados com diferentes dietas com a inclusão de prebióticos como os frutoligossacarídeos (FOS), os galactoligossacarídeos (GOS) e a inulina.

REVISÃO DE LITERATURA

1. PREBIÓTICOS

Por definição prebióticos são alimentos não-digeríveis por enzimas endógenas do hospedeiro que estimulam o crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal (TGI) (Gibson e Roberfroid, 1995). Essa definição vem sendo aceita por anos, e no ano de 2016, a Associação Científica Internacional de Prebióticos e Probióticos (ACIPP) definiu que prebiótico é “um alimento utilizado seletivamente como substrato pelos microrganismos do intestino do hospedeiro que conferem efeitos benéficos a saúde” (Gibson *et al.*, 2017). A fermentação desse substrato resulta na modulação da microbiota intestinal e formação de produtos finais de fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Os prebióticos podem ser divididos em três principais grupos polióis, oligossacarídeos e fibras (Mohanty et al., 2018). O mais comumente utilizado são os oligossacarídeos, como os frutoligossacarídeos (FOS e inulina), os galactoligossacarídeo (GOS), entre outros como manoligossacarídeos (MOS) e xilooligossacarídeos (XOS) (de Paulo et al., 2019).

De acordo com a nomenclatura IUB IUPAC, oligossacarídeos são compostos que possuem entre 3 a 10 moléculas de açúcar, com baixo peso molecular. Os oligossacarídeos são considerado carboidratos não-digeríveis sendo os principais utilizados na nutrição são o hidratos de carbono com uma molécula de frutose, galactose, glicose ou xilose. Esses oligossacarídeos podem ser sintetizados a partir da hidrólise enzimática dos polissacarídeos ou da extração direta de vegetais (Mussatto e Mancilha, 2007).

Para um alimento ser considerado como prebiótico, é necessário que atenda alguns pré-requisitos como: ser resistente ao pH do estômago; ser resistente a atividade enzimática e não ser absorvido pelo TGI; servir como substrato para as bactérias intestinais proporcionando atividade fermentativa e, por último, deve estimular o crescimento e/ou seleção das bactérias benéficas que atuam na produção de compostos que melhoram a saúde do hospedeiro (Gibson et al., 2010).

Seguindo essa definição e os critérios mencionados, prebióticos são considerados pela indústria como alimentos funcionais. Com a expansão do mercado pet, visando um produto final com um maior valor agregado e que traga mais benefícios para os animais, o aumento de pesquisas com esses alimentos é de grande relevância para a entender os efeitos e quais os resultados benéficos para a saúde do animal que a ingestão dos mesmos pode proporcionar. Kanakput et al. (2011) avaliaram o efeito da inclusão do FOS e GOS individualmente e de forma combinada na dieta de gatos adultos e concluíram que houve efeitos positivos para a saúde intestinal desses animais. De modo semelhante, Pinna et al. (2018) observaram que cachorros adultos suplementados com FOS tiveram efeitos na modulação da microbiota e melhoria na digestibilidade dos minerais. Ainda, Barry et al. (2010) observaram o mesmo resultado em relação à modulação da microbiota com a adição de FOS na dieta para gatos.

Como os principais efeitos da ingestão desses alimentos prebióticos, podemos citar a modulação da microbiota intestinal e a produção de produtos finais de fermentação (AGCC), como, por exemplo, o butirato, acetato e propionato (Gullón et al., 2010). Esses ácidos graxos estão relacionados diretamente às mudanças no lúmen intestinal como

melhorar a absorção de minerais, metabolismo lipídico e também favorecendo um meio para a proliferação das bactérias benéficas e, assim, diminuindo a proporção de bactérias patogênicas (Dávila et al., 2019).

Alguns microrganismos, como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, são responsáveis pela síntese dos carboidratos não-digeríveis (Mano et al., 2017). Atualmente, as empresas visam uma produção mais sustentável. Assim, a síntese desses oligossacarídeos por meio dos microrganismos podem envolver diferentes substratos como resíduos agroindústrias. Como resíduos do milho, outras fontes que podem ser usadas para a síntese desses prebióticos também são alimentos como farelo de trigo, farelo de arroz (de Paulo et al., 2019). Como no estudo de Nobre et al. (2018), no qual os autores testaram a produção de FOS por meio da proliferação de *Aspergillus ibericus* em meio enriquecido com sacarose produziu aproximadamente 0,64g de FOS para cada g de sacarose.

A partir de estudos avaliando a inclusão de prebióticos na dieta para cães e gatos, sugere-se que a suplementação resulta em melhoria na saúde do hospedeiro, porém deve-se atentar para a ingestão da inclusão de doses elevadas, pois pode causar desconforto intestinal para o animal devido ao aumento da fermentação intestinal, (Barry et al., 2010). O excesso de fermentação sacarolítica pode resultar em quadros de diarreias, pois seus os AGCC, podem modular a absorção de água alterando a pressão osmótica no cólon (NRC, 2006).

1.1. FRUTOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Os FOS, são classificados como frutanas, que são polímeros de frutose, podendo ser naturais, derivados de plantas, como a inulina, ou sintéticos, resultante da polimerização da frutose (Gibson e Roberfroid, 1995). O FOS é altamente fermentável por bactérias lácticas no intestino, enquanto microrganismos gram-negativos, como *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* são incapazes de fermentar esse substrato. As bifidobactérias, presentes no intestino grosso, secretam a β -frutosidase, enzima que hidrolisa FOS, responsável pela liberação dos monômeros de frutose (Macedo et al., 2020).

Em um estudo, avaliando a inclusão de 2% de FOS combinado com 1% MOS em dietas de cães adultos, os autores observaram que houve modulação na microbiota e no sistema imune, onde a combinação dos prebióticos aumentou as concentrações de

bifidobactérias e lactobacilos e havendo aumento nos níveis de neutrófilos e linfócitos (Swanson et al., 2002). Porém, Sparkes et al. (1998) não observaram efeitos para o microbioma de gatos suplementados com 0,75% de FOS, o que indica que baixos níveis de suplementação desse prebiótico podem não ser efetivos. Outro fator relevante em relação a dose administrada é que cada animal possui um ecossistema microbiano único, e muitos fatores podem interferir no efeito do prebiótico, como peso corporal, idade, condição clínica (Barzegari e Saei, 2012), esse efeito foi observado por Garcia-Mazcorro et al. (2017) de modo que, alguns animais suplementados com FOS tiveram aumento na abundância relativa para *Lactobacillales*, sugerindo alta resposta ao prebiótico porém outros animais obtiveram altas concentrações deste mesmo grupo mesmo com a dieta basal.

1.2. INULINA

A inulina, é um prebiótico derivado das frutanas, muito comumente encontrada em vegetais como cebola, aspargos, chicória, alho (Mussato e Mancilha, 2007). A inulina é degradada por enzimas originadas das bactérias como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* que sintetizam inulinases (Skowronek e Fiedurek, 2003). A fermentação da inulina pelas bactérias no colón resulta na produção de AGCC, sendo o principal o butirato (Rossi et al., 2005) e lactato, assim como alguns gases (Macfarlane and Gibson, 1997).

Assim como o FOS, a inulina, é influenciada por alguns fatores que afetam os efeitos da suplementação, como por exemplo a combinação da inulina com um alimento de fonte animal ou vegetal, além das características individuais dos animais e o ambiente onde esse animal vive (Verdonk et al., 2005). Um estudo combinou 1,4% de inulina com um dieta à base de carne crua, no qual resultou o aumento das concentrações de AGCC comparada com uma dieta controle (Beloshapka et al., 2012). Ressalta-se que o uso de doses muito elevadas desses prebióticos podem ocasionar diarreias (Pinna e Biagi, 2014). Estudo realizado com a combinação de *Lactobacillus fermentum* e inulina demonstrou um pequeno efeito laxativo, podendo ser utilizado em dietas para cães idosos afim de prevenir a constipação (Strompfová et al., 2013).

No estudo de Garcia-Mazcorro et al. (2017) foi avaliado o efeito da suplementação de uma dieta contendo um *blend* de FOS + inulina em relação à modulação da microbiota de cães adultos. Os autores não constataram diferenças significativas, com

exceção ao grupo *Veillonellaceae*, que houve aumento na abundância relativa. Resultados semelhantes foram obtidos por Beloshapka et al. (2013) com a inclusão de inulina.

1.3. GALACTOLISSACARÍDEO (GOS)

Os galactoligossacarídeos, são oligossacarídeos naturalmente encontrados no leite pois são derivados de moléculas de galactose, através de reações de transgalactosilação pela enzima β -galactosidase (Cardoso et al., 2017), estimulando a proliferação de bactérias como as *Bifidobactérias* e *Lactobacillus*, porém a literatura mostra que a inclusão do GOS também modula as concentração de bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Louis et al., 2016), esse microrganismos estimulam a modulação do sistema imune e a produção dos AGCC.

Devido à estrutura do GOS ser similar às glicoproteínas encontradas na membrana do epitélio intestinal, ele se liga a esses receptores inibindo que bactérias patogênicas se proliferem no colón (Newburg et al., 2005). Biagi et al. (2013) observaram a diminuição dos níveis de amônia presente nas amostras fecais de gatos adultos alimentados com uma dieta contendo uma combinação de 0,5% de GOS. Com a inclusão de *Bifidobacterium pseudocatenunlatum*, esse resultado demonstra que a inclusão do GOS foi benéfica para a saúde intestinal desses animais. A produção dos AGC resultante da fermentação pelo GOS afetam os componentes da imunidade e células inflamatórias (Tizard e Jones, 2018). Em estudo, avaliando a inclusão de 1% de GOS houve aumento na atividade fagocítica, os autores também concluíram que a inclusão deste nível de GOS favoreceu alterações no sistema imune, o que sugere que doses menores que essas podem não promover os efeitos significativos para o sistema imune (Rentas et al., 2018). Kanakput et al. (2011) concluíram também que a suplementação do GOS, FOS ou a combinação (FOS + GOS) devem ser em níveis superiores a 0,5% para observar efeitos significativos.

2. MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal dos mamíferos possui um ecossistema diversificado. Sendo composto por bactérias, fungos, protozoários e vírus, esse conjunto de microrganismos é denominado como microbiota intestinal (Suchodolski, 2011). Podendo ter, dependendo da condição fisiológica do lúmen intestinal, a proliferação de bactérias

patogênicas, porém em um meio onde a flora se encontra em equilíbrio combinado com uma alimentação que proporcione a modulação dessa microbiota, prevalecem a proliferação das bactérias que possuem efeitos benéficos para o hospedeiro.

De acordo com a literatura, estima-se que o intestino dos mamíferos é colonizado por aproximadamente 10^4 a 10^{10} microrganismos, sendo as bactérias anaeróbicas o principal grupo que compõe essa microbiota (Suchodolski, 2011). Para os animais, como cães e gatos, pode-se encontrar cerca de dez filos diferentes de bactérias, sendo os principais os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacterias*, *Proteobacterias* e *Actinobacterias* (Suchodolski e Pilla, 2021). Em gatos, as principais bactérias colonizam o intestino delgado, onde no íleo e no cólon são encontradas maior diversidade bacteriana (Johnston et al., 1993), sendo os principais grupos de bactérias *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterobacteriaceae*. No intestino grosso, são encontradas maiores abundâncias de bactérias dos filos *Firmicutes* e *Fusobacteria*, assim como do grupo *Bacteroides* (Suchodolski, 2011). O gênero *Fusobacterium* é normalmente associado aos efeitos benéficos para a saúde de cães, onde o mesmo efeito não pode ser observado em humanos, pois esse gênero está relacionado à incidência de câncer de cólon (Amitay et al., 2017).

É importante ressaltar que a composição da dieta pode influenciar significativamente na modulação da microbiota e na produção de seus produtos finais de fermentação. Como dietas com alto teor proteico e baixo teor de carboidratos, como no estudo conduzido por Hooda et al. (2013) onde a utilização de uma dieta com alto valor proteico para gatos filhotes aumentou a prevalência dos gêneros *Fusobacteria*, *Clostridium Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Blautia* e *Eubacteria*, todos produtores de butirato. Ainda em relação à composição da dieta, Deusch et al. (2014) observaram que a proporção proteína/carboidrato afetou as vias metabólicas relacionadas com a biossíntese dos aminoácidos, concluindo que a proporção proteína/carboidrato tem efeito na produção de metabólitos pelas bactérias.

Os gatos são animais estritamente carnívoros e é por isso a importância de estudo que avaliam os efeitos que a inclusão de fibras e carboidratos não digestíveis para a modulação da microbiota. No trabalho de Kanakupt et al. (2011) foi observado que a inclusão de 0,5% FOS, GOS e a combinação de GOS+FOS aumentou a abundância das Bifidobactérias resultando no aumento da produção total de AGCC, como o butirato e o valérico. Em um outro estudo, com a inclusão da inulina, os autores também observaram o aumento das Bifidobactérias e a diminuição de *Fusobacterium* (Young et al., 2016).

Pode-se observar um aumento de *Veillonaceae* e uma diminuição de *Gammaproteobacteria* quando fornecido um *blend* de inulina + FOS (Garcia-Mazcorro et al., 2017).

A inclusão apenas da celulose não proporcionou mudanças na modulação da microbiota (Barry et al., 2012), porém quando associado com a inulina foram observados proliferação de gêneros como *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Megamonas*, com a diminuição de *Clostridium*, *Fusobacterium* e *Eubacterium* (Hooda et al., 2013).

Tais bactérias contribuem de uma forma significativa para saúde em geral do animal, pois os metabólitos provenientes da fermentação do substrato pelos microrganismos, possuem efeitos benéficos para o hospedeiro, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e modulação do sistema imunológico (Suchodolski, 2011; Deng e Swanson, 2015).

3. PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO E SAÚDE INTESTINAL

No processo de digestão do TGI, alguns compostos nitrogenados não são absorvidos totalmente, o que gera a proteólise desses compostos pelas bactérias presentes no intestino delgado, resultando em compostos putrefativos ou compostos orgânicos voláteis, como aminas biogênicas, indóis, fenóis, amônia e os ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), esses compostos estão associados com o odor fétido das fezes (Roudebush et al., 2010). Porém algumas bactérias no colón, as quais participam da fermentação de compostos como os oligossacarídeos, esse substrato estimula as bactérias sacarolíticas a produzirem compostos como AGCC (butirato, acetato e propionato) e lactato, que são benéficos para a saúde do hospedeiro. O butirato é utilizado pelas células epiteliais do colón, os colonócitos como principal fonte de energia, já o acetato é utilizado como fonte de energia, principalmente pelo cérebro e os músculos. O propionato é aproveitado pelo fígado atuando na diminuição da produção do colesterol (Slavin, 2013).

Compostos como AGCC, lactato e AGCR, ajudam a manter o pH intestinal abaixo e possuem atividade antibacteriana, para bactérias Gram negativas como *E.coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*, estimulando a proliferação de grupos específicos de bactérias benéficas (Loo e Vancraeynest, 2008). A diminuição do pH no lúmen intestinal contribui para a redução na formação de compostos tóxicos (amônia e aminas biogênicas), não alterou o crescimento de bactérias como as *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* (Slavin, 2013).

Os AGCC podem ser formados por diversas vias metabólicas, as principais são, para a síntese do acetato através da hidrólise por acetil-CoA, originado do piruvato. Para a síntese do propionato, pode-se envolver três vias: succionato, fucose e acrilato pela rota do lactato, e, por último, o butirato pode ser sintetizado através da reação inversa da β -oxidação (Santos, 2015). Um estudo avaliando a inclusão de FOS na dieta de cães adultos mostrou um aumento na produção de lactato e a redução do pH intestinal que pode ser explicada por esse aumento do lactato (Twomey et al., 2003).

Além de ser uma fonte energética para o metabolismo, os AGCC possuem também ação anti-inflamatória, pois estimulam as células T imunorreguladoras, como observado por Arpaia et al. (2013), onde a produção do butirato e do propionato estimularam a formação de células T.

4. SISTEMA IMUNE

O sistema imune pode ser modulado pela dieta fornecida para o indivíduo. A inclusão de prebióticos na alimentação pode promover essa imunomodulação, com o aumento da atividade fagocítica e dos macrófagos, melhorando a barreira epitelial. Essa imunorregulação acontece de forma direta, onde há a produção de componentes benéficos, como produção de muco, melhora na barreira epitelial do TGI. E, de forma indireta, com a produção dos produtos de fermentação oriundos da modulação da microbiota intestinal (Nawaz et al., 2018).

A acidificação do colón pela produção dos AGCC, favorece a produção de mucina, uma glicoproteína que atua na proteção da mucosa do intestino, bem como a ligação aos receptores AGCC em células imunes dentro dos tecidos linfoides associados ao intestino. O GALT (*Gut associated lymphoid tissue*) (Lomax e Calder, 2009) é considerado o maior órgão do sistema imune, pois é nele que estão presentes estruturas linfoides – placa de Peyer e linfonodos mesentéricos. (Stokes e Waly, 2006). Nessas estruturas, temos os linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos (Germane et al., 1999). Como produtos originados do GALT, temos a produção de anticorpos, principalmente IgA e respostas imunes mediadas pelos linfócitos T e os macrófagos.

Quando organismos patógenos se ligam aos receptores na membrana celular, há a fagocitose por parte dos neutrófilos, o fagossomo se liga ao lisossomo formando o fagolisossomo. Os grânulos de estoque se unem a essa estrutura e o material então é

degradado e produzem citocinas, modulando a atividade dos linfócitos T e B, em seguida ocorre o *burst* oxidativo, onde as membranas dos patógenos são destruídas devido à liberação de defensinas e oxidases (Pier, 2004). Assim, o teste de fagocitose e *burst* oxidativo, são formas de avaliar a resposta imune.

O butirato, produzido por *Clostridium* e *Eubacterium*, atua como modulador da acetilação da cauda das histonas (proteína que compõe o nucleossomo), aumentando a acessibilidade de alguns genes e fatores transcricionais (Gourbeyre et al., 2011). Já o acetato e o propionato, produzidos pelas *Bifidobacterias* e *Lactobacillus*, aumentam a atividade da citocina anti-inflamatória IL-10 (Shokryazdan et al., 2017).

Cavaglieri et al. (2003) observaram que os linfócitos, quando cultivados com AGCC produziram maiores concentrações de IL-10, enquanto somente a inclusão do butirato teve menor efeito, Hoseinifar et al. (2016), concluíram que a inclusão de 1 a 2% de GOS na dieta de peixes resultou no aumento da atividade de lisozimas e imunoglobulinas totais.

Assim, a inclusão de prebióticos na dieta, modulam a microbiota, promovendo a proliferação de bactérias lácticas que resultam na produção de compostos benéficos, esses compostos interagem com o sistema imune, estimulando a produção de citocinas, aumento da fagocitose de macrófagos e aumento na síntese de imunoglobulinas (Macfarlane e Cummings, 1999).

REFERÊNCIAS

- AMITAY, E. L., WERNER, S., VITAL, M., PIEPER, D. H., HÖFLER, D., GIERSE, I. J., ... & BRENNER, H. Fusobacterium and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study. *Carcinogenesis*, 38(8), 781-788, 2017.
- BARRY KA, WOJCICKI BJ, MIDDELBOSS IS, VESTER BM, SWANSON KS, FAHEY GC. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. *J Anim Sci*. 88: 2978–87, 2010.

- BARRY, K. A., MIDDELBOS, I. S., VESTER BOLER, B. M., DOWD, S. E., SUCHODOLSKI, J. S., HENRISSAT, B., ... & SWANSON, K. S. Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. *Journal of proteome research*, 11(12), 5924-5933, 2012.
- BARZEGARI, A., & SAEI, A. A. Designing probiotics with respect to the native microbiome. *Future microbiology*, 7(5), 571-575, 2012.
- BELOSHAPKA, A. N., DUCLOS, L. M., BOLER, B. M. V., & SWANSON, K. S. Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. *American journal of veterinary research*, 73(7), 1016-1023, 2012.
- BELOSHAPKA, A. N., DOWD, S. E., SUCHODOLSKI, J. S., STEINER, J. M., DUCLOS, L., & SWANSON, K. S. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology*, 84(3), 532-541, 2013.
- BIAGI, G., CIPOLLINI, I., BONALDO, A., GRANDI, M., POMPEI, A., STEFANELLI, C., & ZAGHINI, G. Effect of feeding a selected combination of galacto-oligosaccharides and a strain of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* on the intestinal microbiota of cats. *American journal of veterinary research*, 74(1), 90-95, 2013.
- CARDOSO, B. B., SILVÉRIO, S. C., ABRUNHOSA, L., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. β -galactosidase from *Aspergillus laticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 67-74, 2017.

- CAVAGLIERI, C. R., NISHIYAMA, A., FERNANDES, L. C., CURI, R., MILES, E. A., & CALDER, P. C. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro-and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life sciences*, 73(13), 1683-1690, 2003.
- DÁVILA, I., GULLÓN, B., ALONSO, J. L., LABIDI, J., & GULLÓN, P. Vine shoots as new source for the manufacture of prebiotic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 207, 34–43, 2019.
- DEUSCH, O., O'FLYNN, C., COLYER, A., MORRIS, P., ALLAWAY, D., JONES, P. G., & SWANSON, K. S. Deep Illumina-based shotgun sequencing reveals dietary effects on the structure and function of the fecal microbiome of growing kittens. *PloS one*, 9(7), e101021, 2014.
- DE PAULO FARIAS, D., DE ARAÚJO, F. F., NERI-NUMA, I. A., & PASTORE, G. M. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 23-35, 2019.
- GARCIA-MAZCORRO, J. F., BARCENAS-WALLS, J. R., SUCHODOLSKI, J. S., & STEINER, J. M. Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing. *PeerJ*, 5, e3184, 2017.
- GERMAN, A. J., HALL, E. J., & DAY, M. J. Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *Journal of comparative pathology*, 120(2), 129-145, 1999.
- GIBSON, GLENN R.; ROBERFROID, MARCEL B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

- GIBSON, G. R., SCOTT, K. P., RASTALL, R. A., TUOHY, K. M., HOTCHKISS, A., DUBERT-FERRANDON, A., ... & BUDDINGTON, R. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Foods*, 7(1), 1-19, 2010.
- GIBSON, G. R., HUTKINS, R., SANDERS, M. E., PRESCOTT, S. L., REIMER, R. A., SALMINEN, S. J., ... & REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502, 2017.
- GOURBEYRE, P., DENERY, S., & BODINIER, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of leukocyte biology*, 89(5), 685-695, 2011.
- GULLÓN, P., GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J., VAN GOOL, M. P., SCHOLS, H. A., HIRSCH, J., EBRINGEROVÁ, A., et al. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk Xylooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3632–3641, 2010.
- HOODA, S., BOLER, B. M. V., KERR, K. R., DOWD, S. E., & SWANSON, K. S. The gut microbiome of kittens is affected by dietary protein: carbohydrate ratio and associated with blood metabolite and hormone concentrations. *British Journal of Nutrition*, 109(9), 1637-1646, 2013.
- JOHNSTON, K. L., A. LAMPORT, AND R. M. BATT. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. *Vet. Rec.* 132:362–363, 1993.
- KANAKUPT K, VESTER BOLER BM, DUNSFORD BR, et al. Effects of shortchain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. *J Anim Sci* 89:1376–1384, 2011.

- LOUIS, P., FLINT, H. J., & MICHEL, C. How to manipulate the microbiota: prebiotics. *Microbiota of the human body*, 119-142, 2016.
- MACEDO, L. L., VIMERCATI, W. C., & ARAÚJO, C. D. S. Fruto-oligossacarídeos: aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23, 2020.
- MACFARLANE, G. T., & CUMMINGS, J. H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *Bmj*, 318(7189), 999-1003, 1999.
- MACFARLANE, G. T., & GIBSON, G. R. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. In *Gastrointestinal microbiology* (pp. 269-318). Springer, Boston, MA, 1997.
- MANO, M. C. R., NERI-NUMA, I. A., SILVA, J. B. DA, PAULINO, B. N., PESSOA, M. G., & PASTORE, G. M. Oligosaccharide biotechnology: An approach of prebiotic revolution on the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 17–37, 2017.
- MOHANTY, D., MISRA, S., MOHAPATRA, S., & SAHU, P. S. Probiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food bioscience*, 26, 152-160, 2018.
- MUSSATTO, S. I., & MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*, 68(3), 587-597, 2007.

- NEWBURG, D. S., RUIZ-PALACIOS, G. M., & MORROW, A. L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual review of nutrition*, 25(1), 37-58, 2005.
- NOBRE, C., ALVES FILHO, E. G., FERNANDES, F. A. N., BRITO, E. S., RODRIGUES, S., TEIXEIRA, J. A., et al. Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. *LWT- Science and Technology*, 89, 58–64, 2018.
- PIER, G. B., LYCZAK, J. B., & WETZLER, L. M. Immunology, infection, and immunity. In *Immunology, infection, and immunity* (pp. 718-718), 2004.
- PILLA, R., & SUCHODOLSKI, J. S. The gut microbiome of dogs and cats, and the influence of diet. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 51(3), 605-621, 2021
- PINNA, C., & BIAGI, G. The utilisation of prebiotics and synbiotics in dogs. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1), 3107, 2014.
- PINNA, C., VECCHIATO, C. G., BOLDUAN, C., GRANDI, M., STEFANELLI, C., WINDISCH, W., ... & BIAGI, G. Influence of dietary protein and fructooligosaccharides on fecal fermentative end-products, fecal bacterial populations and apparent total tract digestibility in dogs. *BMC veterinary research*, 14(1), 1-10, 2018.
- RENTAS, M. F., PEDREIRA, R. S., PERINI, M. P., RISOLIA, L. W., ZAFALON, R. V. A., ALVARENGA, I. C., ... & BRUNETTO, M. A. Galactooligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. *PLoS One*, 15(8), e0238006, 2020.
- ROSSI, M., CORRADINI, C., AMARETTI, A., NICOLINI, M., POMPEI, A., ZANONI, S., & MATTEUZZI, D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6150-6158, 2005.

- SANTOS, J. P. F. Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2015.
- SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435, 2013.
- SPARKES, A. H., PAPASOULIOTIS, K., SUNVOLD, G., WERRETT, G., CLARKE, C., JONES, M., ... & REINHART, G. Bacterial flora in the duodenum of healthy cats, and effect of dietary supplementation with fructooligosaccharides. *American journal of veterinary research*, 59(4), 431-435, 1998.
- SKOWRONEK, M., FIEDUREK, J. Insulin and insulinases – properties, applications and possible future use (in Polish). *Przem. Spoż.*, 3: 18–20, 2003
- STROMPFOVÁ, V., LAUKOVÁ, A., & CILIK, D. Synbiotic administration of canine-derived strain *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 and inulin to healthy dogs. *Canadian journal of microbiology*, 59(5), 347-352, 2013.
- SUCHODOLSKI, J. S. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of animal science*, 89(5), 1520-1530, 2011.
- SWANSON, K., GRIESHOP, C., FLICKINGER, E., HEALY, H. P., DAWSON, K. A., MERCHEN, N. R., ... & FAHEY JR, G. C. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. *Archives of Animal Nutrition*, 56(4), 309-318, 2002.
- TIZARD, I. R., & JONES, S. W. The microbiota regulates immunity and immunologic diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(2), 307-322, 2018.

VERDONK, J. M. A. J., SHIM, S. B., VAN LEEUWEN, P., & VERSTEGEN, M. W. A.
Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S125-S138, 200

YOUNG, W., MOON, C. D., THOMAS, D. G., CAVE, N. J., & BERMINGHAM, E. N.
Pre-and post-weaning diet alters the faecal metagenome in the cat with differences in vitamin and carbohydrate metabolism gene abundances. *Scientific Reports*, 6(1), 1-16, 2016.

II. Uso de oligossacarídeos com ação prebiótica em gatos adultos

(Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente, as características fecais, modulação da microbiota e parâmetros imunológicos de gatos alimentados com dietas com a inclusão de frutoligossacarídeo (FOS), galactoligossacarídeo (GOS) e inulina. Foram formuladas seis dietas: 1 - controle negativo (CN), sem inclusão de prebióticos; 2 e 3 – CN com a inclusão de 0,8% de FOS (foram utilizados dois FOS, denominados FOS₁ e FOS₂, com diferentes composições), 4 – CN com inclusão de 0,8% de GOS, 5 – CN com a inclusão de 0,8% de inulina e 6 – CN com a inclusão de 0,8% de FOS₁ + inulina. Cada dieta foi oferecida para seis gatos adultos (n=6), totalizando 36 gatos, em um delineamento em blocos casualizados no tempo. Para os produtos finais de fermentação intestinal, foi utilizada a análise estatística multivariada (MANOVA) e a análise de correlações canônicas entre estes com os tratamentos. A microbiota intestinal foi comparada por estatística não-paramétrica. Não foi observado diferença significativa para os tratamentos em relação aos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA). Houve efeito significativo para tratamento (p=0,02235) em relação aos produtos de fermentação, onde os tratamentos com FOS e GOS apresentaram aumento para formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de cadeia ramificada (AGCR). A microbiota dos animais não foi modificada durante o período de estudo, porém observou-se uma maior diversidade bacteriana para o tratamento com a inclusão do GOS. No presente estudo, pode-se concluir, que a inclusão de prebióticos não alterou os CDAs, porém, aumenta a produção de produtos finais de fermentação e pode-se observar uma maior diversidade de diferentes microrganismos para o tratamento com GOS, apresentando este prebiótico potencial de uso para a espécie.

Palavras-chaves: carboidratos não-digeríveis, AGCC, produtos de fermentação, modulação, microbiota intestinal, sistema imune

INTRODUÇÃO

É de grande importância o desenvolvimento de produtos que ajudam a promover a saúde e bem-estar dos animais de companhia, principalmente cães e gatos, devido à importância afetiva que esses animais possuem com seus tutores (Baffoni *et al.*, 2017). Estudos indicam que a inclusão de ingredientes, com as fibras e carboidratos solúveis possuem efeitos benéficos para a saúde desses animais (De Godoy *et al.*, 2013).

Com a expansão do mercado pet e a preocupação da inclusão de alimentos com valor agregado para garantir uma alimentação balanceada com produtos de alta qualidade, visando a melhora na expectativa de vida dos cães e gatos, o uso de prebióticos tem sido explorado devido aos benefícios que esses alimentos oferecem ao animal (Jugan *et al.*, 2017). Prebióticos são definidos como alimentos não-digeríveis e seletivamente fermentados, estimulando o crescimento e atividade de grupos específicos de bactérias que compõem a microbiota intestinal. Esses alimentos estão diretamente relacionados às alterações no trato gastrointestinal que induzem no animal (Venter, 2007).

O principal grupo de prebióticos são os oligossacarídeos, como frutoligosacarídeos (FOS), inulina e galactoligosacarídeos (GOS). Esses oligossacarídeos são utilizados como substrato para as bactérias, estimulando a modulação da microbiota, efeitos positivos na digestibilidade aparentes dos nutrientes e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Schimtz & Suchodolski, 2016).

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na fisiologia intestinal, sendo composta por um conjunto complexo e dinâmico de microrganismos (Hamer *et al.*, 2011). A microbiota dos gatos é composta principalmente por bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria* (Pilla e Suchodolski, 2021). Onde os filos *Firmicutes* e *Bacteroidota* atuam na estabilidade da homeostase do trato gastrointestinal (TGI) e também na modulação do sistema imune (Stojanov *et al.*, 2020).

Cada espécie bacteriana utiliza um substrato diferente para a produção dos produtos finais de fermentação, como por exemplo, as bactérias sacarolíticas que utilizam como substrato as fibras e os carboidratos solúveis e outras, como as proteolíticas que utilizam proteínas como substrato, desta forma a composição da dieta influencia diretamente nas alterações da microbiota do hospedeiro (Pilla e Suchodolski, *et al.*, 2021).

A fermentação pode ter consequências positivas e negativas na funcionalidade do trato gastrointestinal (TGI), e isso depende diretamente do substrato fornecido para a microbiota. A fermentação de carboidratos leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta que favorecem a proliferação de bactérias lácticas (Barry *et al.*, 2010) ou bactérias como *Clostridium* e *Fusobacterium* utilizam substratos proteicos para a produção de butirato. (Vital *et al.*, 2015). Porém, o aumento de resíduos de aminoácidos no intestino pode provocar a produção de compostos como amônia, aminas biogênicas ácidos graxos de cadeia ramificada, fenóis e indóis que têm influência negativa para o hospedeiro (Swanson *et al.*, 2002).

Visando a importância de uma dieta que não só atenda a exigência nutricional para manutenção do animal, mas que possa oferecer efeitos benéficos para a saúde em geral, objetivou-se nesse estudo, avaliar os efeitos de diferentes aditivos com ação prebiótica sobre as características fecais, coeficientes de digestibilidade e energia metabolizável, assim como a produção de produtos finais de fermentação e a modulação da microbiota intestinal em gatos adultos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, sob o número de protocolo 1003180121. O trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Estudos Nutricionais em Felinos Domésticos, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá.

Dietas experimentais

Foram formuladas seis dietas experimentais, sendo uma dieta Controle Negativo (CN), para gatos adultos em manutenção, atendendo aos níveis nutricionais recomendados pelo FEDIAF (2020). Este alimento não apresentava qualquer ingrediente com efeito prebiótico. A partir do alimento CN, outras cinco formulações foram obtidas, pela substituição de diferentes prebióticos à celulose presente na formulação da CN, conforme segue:

FOS₁ –inclusão de 0,8% de um produto comercial contendo 75% de FOS

(YES-FOS, Yessinergy do Brasil Ltda, Campinas, Brasil);

FOS₂ - inclusão de 0,8% de um produto comercial contendo 95% de FOS

(Fortifeed P-95, Ingredion – GTC Nutrition, Illinois, EUA);

GOS - inclusão de 0,8% de um produto comercial contendo 60% de GOS

(YES-GOS, Yessinergy do Brasil Ltda, Campinas, Brasil)

INU - CN com a inclusão de 0,8% de um produto comercial contendo 70% de INU

(Orafti-SIPX, Beneo Orafti, Belgica)

INU+FOS - CN com a inclusão de 0,4% de INU e 0,4% do FOS₁.

Foram utilizados dois FOS com composições diferentes, afim de avaliar se um mesmo tipo de prebiótico, mas como composições diferentes, resulta em diferenças em relação aos efeitos no hospedeiro.

A adição desses compostos foi feita antes do processo de extrusão das dietas, na mistura pré-moagem, em substituição a celulose. Para garantir a boa homogeneização, foi realizada uma pré-mistura com cada prebiótico juntamente com os microingredientes da formulação e parte do glúten de milho. Os ingredientes utilizados e a análise de sua composição química podem ser verificados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU
Milho	33,70	33,70	33,70	33,70	33,70	33,70
Quirera de arroz	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Farinha de Vísceras de frango	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00
Gluten de Milho	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Gordura de aves	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Celulose	2,00	1,20	1,37	1,20	1,14	1,17
Palatabilizante	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Cloreto de potássio	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Premix para gatos	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Antioxidante sintético	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Propionato de cálcio	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
FOSy	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00	0,40
GOS	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00
Inulina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	0,43
FOSc	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yessinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredion; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS₁ associado a INU.

*Enriquecimento premix: Vitamina A (mín) 3.750.000U.I, Vitamina D3 (mín) 300.000U.I, Vitamina E (mín) 25.000U.I, Vitamina K3 (mín) 300mg, Vitamina B1 (mín) 1.000mg, Vitamina B2 (mín) 3.250mg, Ácido pantotênico (mín) 7.500mg, Vitamina B5 (mín) 1.500mg, Vitamina B12 (mín) 9.00 mcg, Vitamina C (mín) 25g, Ácido nicotínico (mín) 12,5g, Ácido fólico (mín) 150mg, Biotina (mín) 63mg, Colina (mín) 110g, Ferro (mín) 20g, Cobre (mín) 1.850 mg, Manganês (mín) 1.250 mg, Zinco (mín) 30g, Iodo (mín) 375mg, Selênio (mín) 27mg

Tabela 2. Composição química analisada das dietas experimentais.

Item	Composição Química analisada (na MN)					
	Tratamentos ¹					
	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU
Umidade (%)	6,32	6,14	7,00	7,91	6,48	7,59
Matéria Seca (%)	93,68	93,86	93,00	92,09	93,52	92,41
Matéria Orgânica (%)	95,03	93,99	94,85	94,47	95,18	94,57
Matéria Mineral (%)	4,97	6,00	5,15	5,52	4,82	5,43
Proteína Bruta (%)	31,16	29,66	30,35	29,58	29,94	29,82
Fibra Bruta (%)	2,99	2,60	2,44	2,92	2,13	2,18
Extrato Etéreo (%)	10,59	10,82	10,71	10,58	10,89	10,39
Energia Bruta (kcal/kg)	4.694	4.664	4.679	4.584	4.644	4.614

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yesssinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredient; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS₁ associado a INU.

As dietas passaram pelo processo de extrusão na fábrica de rações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), no campus situado na cidade de Jaboticabal. Após pronta e ensacadas, as dietas receberam recobrimento com gordura de aves e palatilizante para gatos.

Animais, instalações e alimentação

Foram utilizados 36 gatos adultos castrados, peso médio de 4,27±0,36 kg, e com idade média de 3,5±2,12 anos, vacinados, desvermifugados e livres de ectoparasitas. Com condição do escore corporal dos animais variando de 5 a 6 (Laflamme, 1997). Cada animal foi alimentado de acordo com sua necessidade energética de manutenção (NEM), calculado como $NEM (kcal) = 75 \times (\text{peso corporal (kg)})^{0,67}$. Os alimentos foram pesados diariamente e fornecidos em duas refeições iguais, uma no período da manhã e outra pelo período da tarde. A água foi fornecida *ad libitum*. As sobras de alimento foram pesadas todos os dias para determinação do consumo alimentar.

O período experimental teve duração de 50 dias, dividido em três blocos com 12 animais em cada, totalizando 6 repetições por tratamentos. Durante o período de adaptação para coleta de fezes para digestibilidade, produtos de fermentação intestinal e análise da composição da microbiota fecal os animais ficaram alojados em um gatil (49m²) com acesso a uma área externa (49m²) para socialização e atividades físicas. No momento da oferta do alimento (8:00 e 14:00), os gatos foram alojados em gaiolas metabólicas (0,5 x 0,5 x 0,6 m) por 120 min. Para a coleta de material para a digestibilidade, produtos de fermentação intestinal e microbiota fecal, os animais ficaram alojados em tempo integral em gaiolas metabólicas.

Determinação da digestibilidade aparente, energia metabolizável e avaliação do pH urinário

O ensaio de digestibilidade foi conduzido pelo método de coleta total de fezes, sem coleta de urina, considerando-se recomendações da AAFCO (2010). Foram cinco dias de adaptação para as dietas, seguido de cinco dias de coleta. As fezes foram coletadas duas vezes ao dia, pesadas e acondicionadas em plásticos individuais previamente identificados e armazenadas em freezer (-15°C), para posterior realizações de análises laboratoriais.

Ao final do período experimental, as fezes foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas de maneira a compor uma única amostra por animal e secas em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72 horas. As amostras de fezes pré-secas e dietas foram moídas em moinho tipo faca, com peneira de 1 mm e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal. Assim como as dietas, as fezes foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca à 105°C (MS, método 934.01), proteína bruta (PB, método 954.01), fibra bruta (FB, método 962.10), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA, método 954.02) e matéria mineral (MM, método 942.05), segundo procedimentos descrito pelo AOAC (1995). A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica (Parr Instrument Co. AC720, EUA). Todas as análises foram conduzidas em duplicata, sendo repetidas aquelas com variação maior que 5%.

A fração correspondente aos extrativos não nitrogenados (ENN) foi determinada segunda fórmula:

$$\text{ENN\%} = 100 - (\% \text{UM} + \% \text{PB} + \% \text{FB} + \% \text{EEA} + \% \text{MM}), \text{ sendo UM o teor de umidade da amostra } (100 - \% \text{MS}).$$

A fração correspondente a matéria orgânica (MO) foi determinada segundo a fórmula:

$$\text{MO\%} = 100 - \text{MM\%}.$$

Com base nos resultados laboratoriais, foram calculados para as dietas os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, seguindo a seguinte equação:

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

A energia metabolizável foi calculada, considerando os valores de energia digestiva e proteína digestível das dietas.

O protocolo para a determinação do pH urinário foi efetuado segundo descrito pela ABINPET (2019), considerando cinco dias de adaptação e três dias de coleta total de urina. Para isto, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com aparato para coleta separada de fezes e urina. A urina foi coletada em recipiente contendo 100mg de Tymol (Sigma Aldrich, São Paulo), para evitar a degradação, e o pH foi medido a partir do pool de urina coletado de cada animal em um período de 24 horas.

Avaliação fecal, determinação de produtos de fermentação intestinal e microbiota fecal

A avaliação fecal foi realizada por meio da análise do teor de matéria seca fecal (MSf), pH fecal e escore de consistência fecal. Para o escore fecal, foram atribuídas notas de 1 a 5 às fezes, sendo 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias e mal formadas; 3 = fezes macias, formadas e úmidas; 4 = fezes bem formadas e consistentes; 5 = fezes bem formadas, duras e secas, de acordo com Carciofi *et al.* (2009).

Ao término do período de 21 dias de adaptação para cada bloco, foi realizado 3 dias de coleta de fezes frescas, com até 15 minutos após a defecação, para determinação do pH fecal, ácidos graxos voláteis (AGV), nitrogênio amoniacal fecal, lactato fecal e microbiota fecal.

Para a aferição do pH fecal, 2 gramas de fezes frescas foram diluídas em 6 mL de água miliQ e o pH foi avaliado em pHmetro digital de precisão (pHmetro Digimed DM 22, São Paulo, SP, Brasil). Para a determinação de AGV (acético, propiônico, butírico, isobutírico, isovalérico, 4-metil-valérico, hexanóico e heptanóico) e nitrogênio amoniacal fecal, 5 gramas de fezes frescas foram coletadas e rapidamente homogeneizadas e misturadas a 15 mL de solução de ácido fórmico a 16% (1:3 p/v). Esta mistura permaneceu refrigerada, sendo centrifugada três vezes a 4.500 rpm, durante 15 minutos cada, aproveitando-se o sobrenadante e desprezado o sedimento. Depois de preparadas as amostras, foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C) e, posteriormente, encaminhadas para análise no Laboratório de Química, da Universidade Estadual de Maringá para a determinação dos AGVs por cromatografia gasosa (Erwin *et al.*, 1961). O nitrogênio amoniacal das fezes foi determinado por adaptação do método de Kjeldahl. Foram utilizados os extratos preparados para dosagem de AGVs, os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e alíquotas de 2 mL foram transferidas para

tubos de ensaio, estas sendo diluídas em 13 mL de água destilada e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio (Tecnal T-036/1, Piracicaba, Brasil). A destilação foi realizada com 5 mL de hidróxido de potássio KOH 2 mol/L e o nitrogênio recebido em um erlenmeyer com 10 mL de solução (ácido bórico 0,97 N). A seguir, foi realizada a titulação de cada amostra com HCl (0,005 N).

Para a determinação do lactato fecal, foi preparado o extrato, a partir da homogeneização de três gramas de fezes frescas diluídas em 9 mL de água destilada, esta mistura permaneceu refrigerada, sendo centrifugada três vezes a 4.500 rpm, durante 15 minutos cada, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando o sedimento, depois de preparadas as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C). A concentração de ácido láctico foi determinada pelo método descrito por Pryce (1969) por colorimetria (modele Janway 6305, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de $\lambda = 630$ nm.

A microbiota fecal foi avaliada no final do ensaio, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. As fezes frescas foram coletadas imediatamente após defecação com luvas estéreis no 25 ° dia. Aproximadamente 2 gramas de cada amostra, foram colocados em eppendorfs estéreis individuais e identificados para cada animal. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até a análise. Foi utilizado o kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep® da Zymo Research para extrair o DNA das amostras, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm usando um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (ThermoScientific). Para avaliar a integridade do DNA extraído, todas as amostras foram processadas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com 1% solução de brometo de etídio, e visualizado com luz ultravioleta em um transiluminador de luz ultravioleta.

Um segmento de 460 bases da região hipervariável V3V4 do gene ribossomal 16S rRNA foi amplificado usando os primers universais nas seguintes condições de PCR: 95 °C por 3 min; 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, seguido de etapa à 72 °C por 5 min. A biblioteca metagenômica foi construída a partir desses amplicons usando o kit comercial Nextera DNA Library Preparation Kit da Illumina®. Posteriormente, os amplificados foram sequenciados no sequenciador Illumina® MiSeq (Degnan e Ochman, 2012). As leituras obtidas foram analisadas na plataforma QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010, 2011), seguindo um fluxo de trabalho com remoção de sequências de baixa qualidade, filtração, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros

bacterianos através do reconhecimento de Variantes de Sequências de Amplicons (ASVs), neste caso, a homologia entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar as sequências, foi utilizada a atualização (SILVA 138) do ano 2019 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA database (Yilmaz et al., 2013).

Para gerar a classificação das comunidades bacterianas por identificação de ASVs, foram utilizadas 35.872 leituras por amostra, com a finalidade de normalizar os dados e não comparar amostras com diferentes números de leituras.

Determinação de parâmetros imunológicos

Coletas de sangue

Ao final de cada bloco, no 25º, 30º, 50º dia do período experimental, foi realizada coleta de sangue dos animais. Os animais foram submetidos ao jejum alimentar de 12 horas antes da coleta. Foi coletado aproximadamente, cerca de 2 a 3mL de sangue da veia jugular de cada gato em tubos de vidro contendo heparina anticoagulante. Após esse procedimento as amostras foram mantidas refrigeradas (2 a 8°C) e enviadas imediatamente para análise (teste de fagocitose e leucograma) para o laboratório (Imunova Análises Biológicas, Curitiba, Paraná, Brasil).

Imunoglobulina (IgA)

O IgA foi coletado juntamente com os produtos de fermentação. Aproximadamente 2 gramas de cada amostra foram colocados em tubos estéreis individuais e identificados para cada animal. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C e enviadas posteriormente ao laboratório (Imunova Análises Biológicas, Curitiba, Paraná, Brasil) para quantificação.

Delineamento e análise estatística

O estudo foi delineado em blocos casualizados, sendo o período o fator de blocagem. O experimento foi composto por seis tratamentos repetidos em três períodos com 12 gatos em cada (sendo dois gatos por tratamento), totalizando seis repetições por tratamento (n=36 total).

As variáveis mensuradas de cada experimento foram previamente analisadas quanto à normalidade e igualdade de Variância. Os coeficientes de digestibilidade aparente foram entre os tratamentos foram comparados pelo Teste Tukey, a 5% de

probabilidade. Para os produtos de fermentação (amônia, AGCC e AGCR), pH e MS fecal, considerando que estes apresentam uma interdependência entre si, aplicou-se estatística multivariada, por meio da análise de correlações canônicas, também considerando esta como significativa, quando a Análise de Variância Multivariada (MANOVA) apresentou um valor de probabilidade inferior a 5% para a hipótese nula.

Para a microbiota, a comparação estatística entre os grupos nas análises de alfa diversidade foram realizadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon, 1992), aceitando resultados estatisticamente significantes com probabilidade inferiores a 0,05 ($p < 0,05$). As análises para beta diversidade foram realizadas através de perMANOVA presente no pipeline no Qiime 2, utilizando um número de 10.000 permutações. Todas as figuras e análises estatísticas foram realizadas no R. As análises de alfa diversidade foram calculadas pelas bibliotecas “phyloseq”, “vegan” e “Microbiome”.

As diferenças nas abundâncias relativas dos táxons entre todos os grupos experimentais foram estimadas com o teste de Wilcoxon

RESULTADOS

O consumo das dietas foi adequado e não houve ocorrências de diarreia e recusa do alimento durante o período experimental. Os animais consumiram, em média, $74,91 \pm 0,41$ kcal/kg^{0,67}/dia, sendo esse próximo ao recomendado pelo FEDIAF (2020) para animais castrados, de 75 kcal/kg^{0,67}. Os dados de consumo diário de matéria seca, coeficientes de digestibilidade, energia metabolizável e características da urina encontram-se na Tabela 3. Não houve efeito de tratamento sobre os coeficientes de digestibilidade ($P > 0,05$), exceto para a matéria mineral que foi maior para os tratamentos com inclusão de FOS₁, FOS₂, GOS e INU+FOS conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3. Consumo de energia metabolizável, coeficientes de digestibilidade e energia metabolizável das dietas e pH urinários dos gatos consumindo dietas contendo prebiótico.

Item	Tratamentos						P
	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU	
Consumo (kcal/kg ^{0,67} /d)	75,2	74,79	75,01	74,19	74,91	75,31	0,951
Coeficientes de digestibilidade aparente (%)							
Matéria Seca (%)	83,16	85,01	85,29	84,27	84,39	84,83	0,507
Matéria Orgânica (%)	86,45	87,66	88,07	87,05	87,26	87,8	0,679
Matéria Mineral (%)	24,39 ^b	46,21 ^a	38,00 ^a	40,64 ^a	31,51 ^b	37,27 ^a	0,001
Proteína Bruta (%)	88,57	87,87	88,64	88,14	87,4	88,53	0,922
Extrato Etéreo (%)	92,66	93,18	93,26	93,68	92,67	92,74	0,668
Energia Metabolizável (g/kcal)	3,85	3,95	4,02	3,93	3,97	3,95	0,381
pH urinário	6,77	6,9	6,78	6,79	7,01	6,8	0,652

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yesssinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredion; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS₁ associado a INU; P – probabilidade.

Os parâmetros fecais e produtos de fermentação intestinal dos animais encontram-se na tabela 4. O escore fecal possui interesse comercial e as diferenças devem ser levadas em consideração. O escore se manteve no intervalo entre 3,15 e 3,85, sendo estes valores considerados como adequados (Case et al., 2011).

Tabela 4. Médias dos parâmetros fermentativos fecais, escore e matéria seca dos animais dos tratamentos Controle Negativo ou contendo prebióticos.

	Tratamentos					
	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU
Acidos graxos de cadeia curta (mmol/kg MS fecal)						
Acético	26,8	26,1	17,1	28,1	20,4	22,6
Propiônico	7,98	6,97	5,96	9,12	5,17	8,24
Butírico	4,44	4,48	4,1	4,06	2,69	4,86
Acidos graxos de cadeia ramificadas (mmol/kg MS fecal)						
Isobutírico	1,56	1,84	1,49	1,67	1,45	1,71
Isovalérico	1,84	2,34	1,76	1,8	1,64	1,81
Valérico	3,19	3,74	2,81	2,45	2,42	3,11
4-metil-valerico	0,49	0,67	0,22	0,31	0,4	0,24
Hexanoico	0,24	0,35	0,22	0,24	0,25	0,24
Heptanoico	1,9	2,15	1,75	2,06	1,65	1,88
AGCC totais	39,2	37,6	27,1	41,3	28,3	35,7
AGCR totais	7,08	8,59	6,28	6,23	5,91	6,87
Amônia (mg/kg MS fecal)	1,78	2,5	1,88	2,06	1,7	2,11
Lactato (mmol/kgMS fecal)	11,6	12,4	16,9	25,6	14,5	18,7
Escore fecal	4,03	3,6	3,7	3,15	3,85	3,85
pH fecal	6,18	6,1	5,91	5,96	6,14	6,12
MS fecal (%)	40,4	35,6	39,9	34,9	39,0	36,4

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yessinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredion; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS1 associado a INU.

Houve efeito significativo de tratamento pela MANOVA, com valor de probabilidade de 0,02235. Desta forma, procedeu-se com a Análise de correlação Canônica, sendo gerado um gráfico biplot com dois Componentes Principais (CPs), os quais explicaram 68,8% da variação total dos dados (Figura 1).

Conforme pode ser visto na Tabela 4 e nos vetores da correlação canônica na Figura 1, a melhor qualidade fecal, vista pelo escore e MS fecais ficou relacionada com os tratamentos CN, FOS₂, INU e FOS+INU. Por outro lado, a formação de produtos de fermentação intestinal tais como lactato, propionato e acetato foram mais correlacionados com a inclusão de GOS nas dietas e os demais (butirato, AGCR e amônia) apresentaram maior correlação com a inclusão de FOS₁, demonstrando que estes dois tratamentos proporcionaram maior fermentação intestinal que os demais. O pH fecal se relacionou inversamente com os produtos de fermentação, conforme esperado.

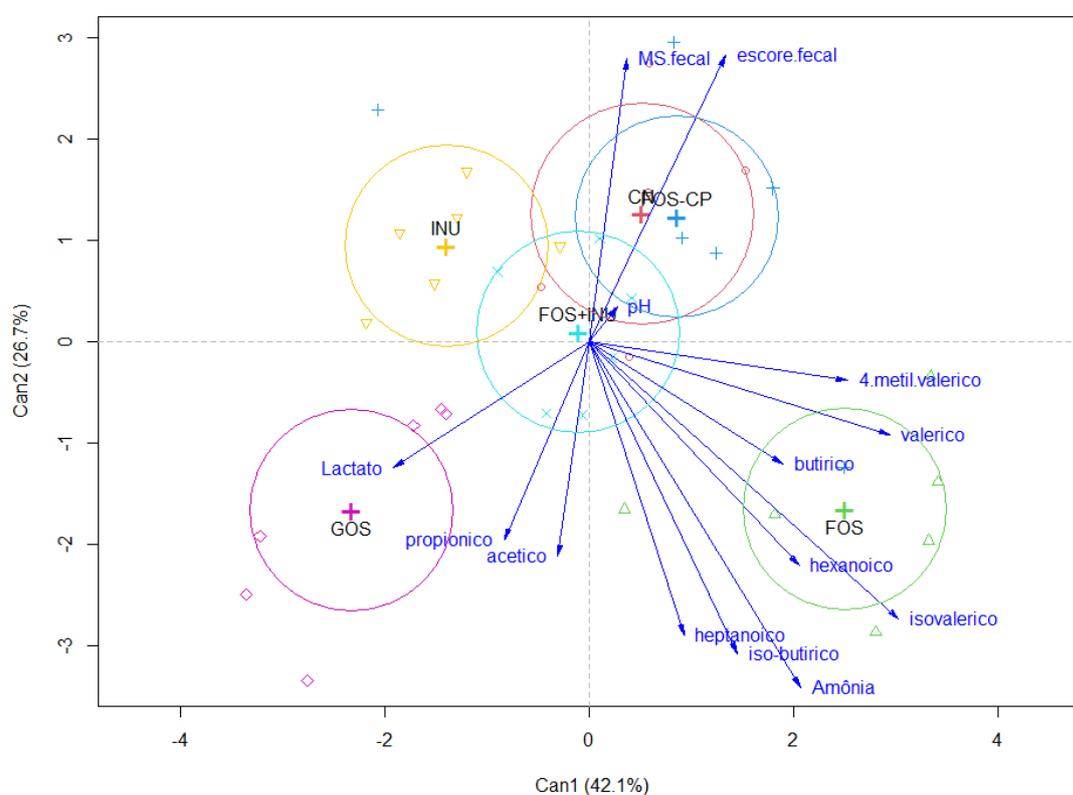


Figura 1. Correlação Canônica para os parâmetros fermentativos e de qualidade fecal entre as dietas experimentais.

O microbioma das fezes dos felinos foi avaliado em relação à composição taxonômica e abundância relativa entre os grupos experimentais. Os resultados referentes a taxonomia ao microbioma intestinal encontram-se divididos nas categorias de filo, família e gênero.

Os filos mais abundantes nas amostras foram *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Campilobacterota* e *Proteobacteria* conforme demonstrado na Figura 2.

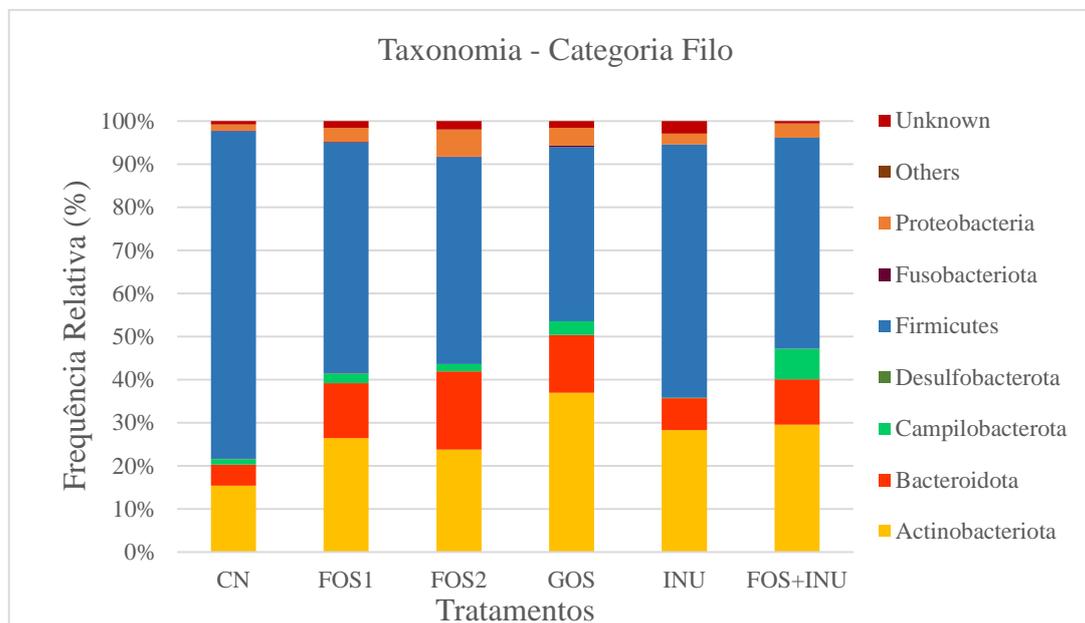


Figura 2. Taxonomia, categoria Filo, das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais

As famílias mais abundantes nas amostras analisadas foram *Veillonellaceae*, *Sutterellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Peptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Fusobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bifidobacteriaceae* e *Bacteroidaceae* de acordo com o demonstrado na Figura 3.

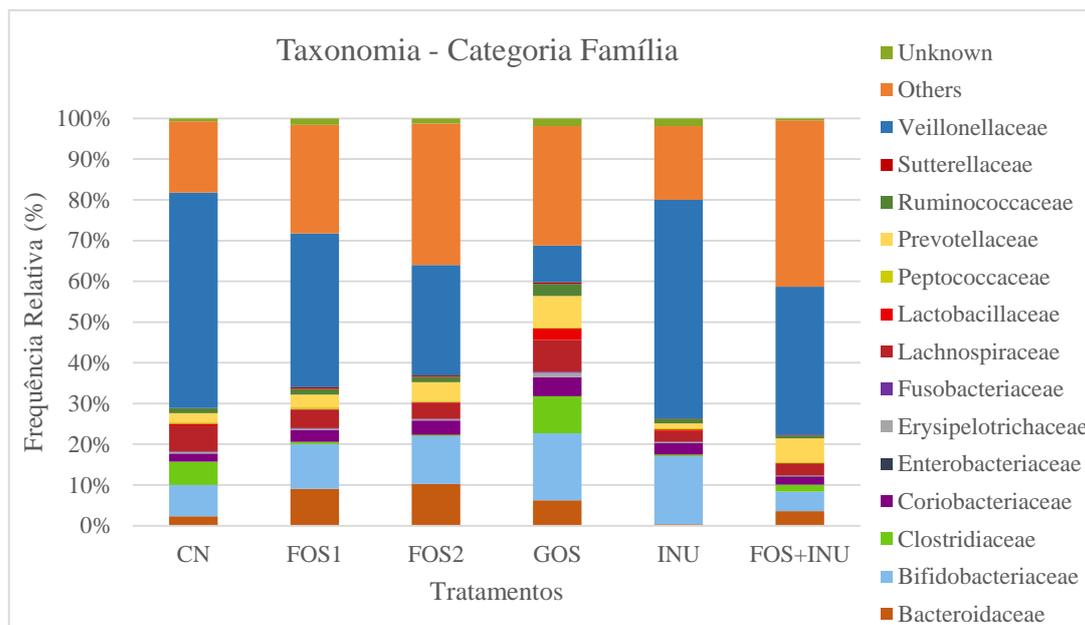


Figura 3. Taxonomia, categoria Família, das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais

Os gêneros mais abundantes nas amostras analisadas foram *Sutterella*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Phascolarctobacterium*, *Peptococcus*, *Parabacteroides*, *Oscillibacter*, *Megasphaera*, *Megamonas*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Faecalitalea*, *Enterococcus*, *Colinsella*, *Clostridium*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* conforme demonstrado na Figura 4.

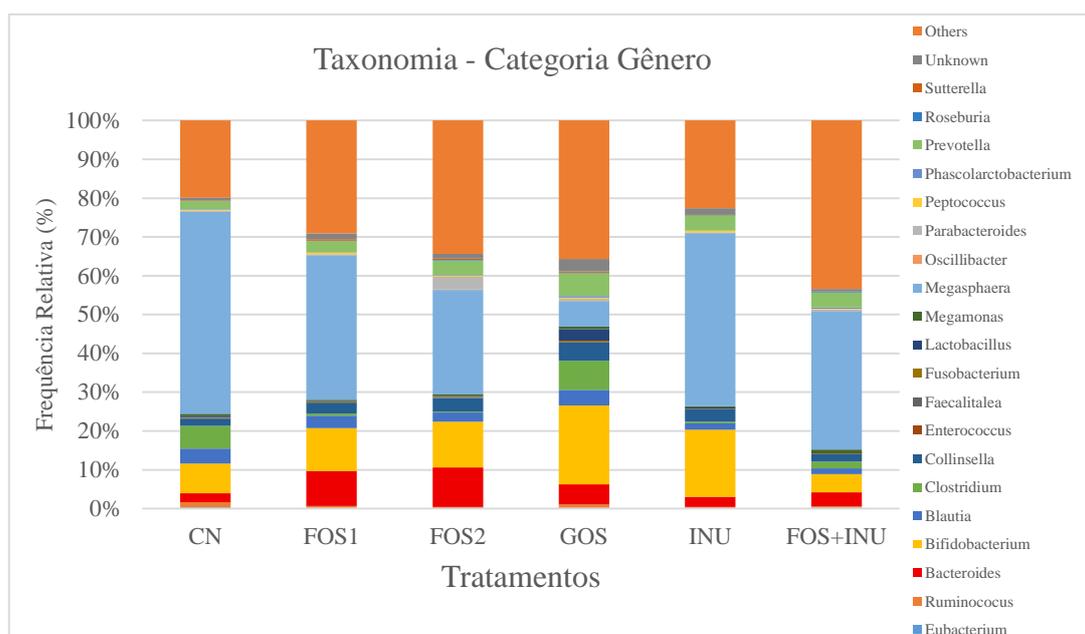


Figura 4. Taxonomia, categoria Gênero, das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais

As médias das relativas concentrações dos principais filos bacterianos presentes nas fezes dos animais não difeririam entre os tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 5). No presente estudo, os três filos predominantes foram, Firmicutes, Actinobacteriota e Bacteroidota.

Tabela 5. Médias das relativas concentrações dos principais filos bacterianos presentes nas fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.

Filo (%)	Tratamentos						P
	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU	
<i>Actinobacteriota</i>	15,400	26,460	23,800	37,000	28,300	29,560	
<i>Bacteroidota</i>	4,930	12,750	18,130	13,360	7,390	10,530	
<i>Campilobacterota</i>	1,200	2,150	1,710	3,170	0,160	7,050	
<i>Desulfobacterota</i>	0,080	0,110	0,000	0,010	0,020	0,030	
<i>Firmicutes</i>	76,070	53,550	48,000	40,490	58,620	49,010	
<i>Fusobacteriota</i>	0,160	0,170	0,170	0,250	0,130	0,010	
<i>Proteobacteria</i>	1,450	3,250	6,300	4,160	2,460	3,310	
Other	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,030	
Unknown	0,700	1,540	1,880	1,550	2,900	0,480	

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yesssinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredient; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS₁ associado a INU; P – probabilidade.

O filo predominante e gênero bacteriano, expresso como porcentagem média do total de sequências, nas fezes dos animais encontram-se descritos na tabela 6. A utilização dos prebióticos não afetou a riqueza das comunidades bacterianas presentes nas fezes dos gatos ($P>0,05$).

Tabela 6. Filo predominante e gênero bacteriano (expresso como porcentagem média do total de sequências) das fezes de gatos alimentados com as dietas experimentais.

Filo	Família	Gênero (%)	Tratamentos						P
			CN	FOS1	FOS2	GOS	INU	FOS+INU	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	5,7852	0,5613	0,2796	7,5224	0,4431	1,7484	
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	0,3401	0,2144	0,1020	0,1867	0,1565	0,2999	
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	1,3264	0,4700	0,3194	0,8950	0,2795	0,3044	
		<i>Blautia</i>	3,8515	3,2080	2,3397	4,0241	1,6135	1,4905	
		<i>Roseburia</i>	0,1191	0,1221	0,1760	0,1241	0,0252	0,2815	
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i>	0,0722	0,0588	0,0898	0,0669	0,0252	0,0104	
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	0,4490	0,2062	0,2288	2,9528	0,3134	0,0068	
	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Megamonas</i>	0,4596	0,2261	0,5124	0,6712	0,3278	0,9825	
		<i>Megasphaera</i>	52,1052	37,0926	26,8573	6,6462	44,7088	35,6991	
		<i>Phascolarctobacterium</i>	0,1057	0,0656	0,1711	0,4202	0,0711	0,3004	
<i>Peptococcaceae</i>	<i>Peptococcus</i>	0,2619	0,3550	0,3206	0,3199	0,3697	0,2170		
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Paraprevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	2,0448	2,9003	3,7090	5,8925	3,9752	3,8975	
	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	2,3058	9,0738	10,1976	5,1945	2,6133	3,5831	
	<i>Tannerellaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	0,2378	0,4174	3,2896	0,4675	0,2136	0,5327	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	7,6654	10,9738	11,8312	20,4186	17,3678	4,7385	
	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella</i>	1,9310	2,8432	3,4804	4,7035	3,1812	1,9768	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Sutterella</i>	0,1277	0,3742	0,3170	0,3422	0,0619	0,1570	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	0,0846	0,0355	0,0157	0,2144	0,0474	0,1450	
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>	0,1570	0,1708	0,1726	0,2466	0,1329	0,0103	

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yesssenergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredion; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS₁ associado a INU; P – probabilidade.

Para os parâmetros imunológicos avaliados, não foi observado diferença significativa ($P > 0,05$) para os parâmetros sanguíneos referentes à fagocitose de monócitos e granulócitos e para leucócitos totais (Tabela 7). E para o IgA fecal também não foi observado efeitos de tratamento (Tabela 8).

Tabela 7. Monócitos e granulócitos fagocitados e leucócitos totais ex vivo, após 3 semanas dos gatos receberem as dietas experimentais.

Item	Tratamentos						P
	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU	
Monócito fagocíticos (μL de sangue)							
%	56,9	65,49	57,49	60,63	54,54	47,42	0,7732
Número total	160384,4	269162,6	321786,7	214144	282572,8	268610,4	0,4851
Granulócitos fagocíticos (μL de sangue)							
%	1,35	1,55	1,24	1,46	1,07	0,66	0,4542
Número total	2682,98	3836,81	4682,3	4514,15	6399,28	5304,73	0,9044
Leucócitos totais (/uL)	304047,7	397999,7	504287,5	349480,4	543562,9	648355,7	0,4635

% - Relativa aos leucócitos totais; CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yesssinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredion; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS1 associado a INU; P – probabilidade.

Tabela 8. Concentração de IgA fecal nos gatos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos						P
	CN	FOS ₁	FOS ₂	GOS	INU	FOS+INU	
IgA fecal (ug/mL)	1,06	3,09	7,32	4,76	5,95	2,06	

CN – Controle Negativo; FOS₁ – Frutoligossacarídeos da empresa Yesssinergy; FOS₂ – Frutoligossacarídeo da empresa Ingredion; GOS – galactoligossacarídeos; INU – Inulina; FOS+INU – FOS1 associado a INU; P – probabilidade.

DISCUSSÃO

Em relação à digestibilidade aparente dos nutrientes, esse estudo não apresentou efeito de tratamento, exceto para a digestibilidade aparente da matéria mineral que foi melhor para os tratamentos contendo os prebióticos. Santos et al. (2018) observou esse mesmo efeito para a CDA da matéria mineral em gatos suplementados com parede celular de levedura, onde de acordo com os autores essa melhora pode estar relacionada à produção de ácidos orgânicos consequentemente tendo um aumento na absorção dos minerais (Parvaneh et al., 2014). Porém são necessários mais estudos para avaliar esses efeitos. Zentek et al. (2002) relataram uma diminuição do CDA da MS e PB em cães

suplementados com 1% de MOS essa diminuição pode ser explicada pelo aumento microbiano intestinal devido a suplementação do prebiótico levando a uma subestimação do CDA. Por outro lado, Rentas et al. (2020) não observou nenhum efeito nos CDA em cães recebendo dietas com a inclusão de 1% de GOS.

Como observado nesse estudo, houve efeito para tratamento na produção de produtos finais de fermentação intestinal, para o tratamento contendo o prebiótico FOS₁ houve maior produção de amônia e AGCR comparado aos demais tratamentos. O FOS é responsável por estimular a fermentação de microrganismos sacarolíticos no intestino isso possui um efeito benéfico para a saúde intestinal do hospedeiro (Scott et al., 2013), o aumento na produção de AGVs representa um efeito positivo normalmente observado com a suplementação do prebiótico, porém a amônia é produzida por bactérias proteolíticas e é considerada um metabólito com efeito negativo para o animal, onde em grandes quantidades pode ser tóxico, sendo considerado um composto potencialmente cancerígeno. O aumento na produção dos AGCR se dá devido ao aumento da fermentação de compostos nitrogenados (como amônia) pelos microrganismos (Nakae & Elliott, 1965).

Em um estudo onde foi utilizado o prebiótico 1,5% FOS (15g/kg) combinado com a concentração de proteína (baixa proteína 22% e alta proteína 30%) observou que o FOS quando combinado com a alta concentração de proteína não teve o efeito prebiótico (Pinna et al., 2018) relatando um aumento na concentração de amônia. A amônia e os AGVs produzidos pelas bactérias são rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal e, muitas vezes, as fezes podem não indicar a real concentração no cólon (Scott et al., 2013) isso pode justificar a falta do efeito prebiótico na suplementação de FOS no estudo citado, outros autores também relataram aumento nos níveis de amônia em cães que receberam dietas contendo 0,3% e 0,9% de FOS (3 e 9g/kg) (Propst et al., 2003). E, em um estudo com gatos recebendo uma dieta com 4% FOS (40g/kg) também houve o aumento na concentração de compostos proteolíticos (como a amônia e AGCR) (Barry et al., 2010), o aumento da concentração amoniaca foi justificado pela mudança na excreção de nitrogênio da urina para as fezes.

Houdijk (1998) diz que a ausência de carboidratos e a alta concentração de proteínas não digeríveis disponíveis como fonte de energia no intestino grosso pode favorecer o aumento da atividade de bactérias proteolíticas. Porém, a elevada concentração de amônia nas fezes em animais suplementados com FOS também pode ser

explicada pelo potencial sacarolítico dos frutoligosacarídeos no intestino delgado ou no cólon que não foi mantida no intestino grosso (Pinna et al., 2018). Assim, quando uma maior quantidade de bactérias atinge o intestino grosso mais a falta de carboidratos pode levar a atividades mais intensas de fermentação putrefativas (Hammer et al., 2011), resultado visto em estudos com suínos (Houdijk, 1998). Esse efeito foi contrário para os animais que ingeriram a dieta contendo GOS, onde a concentração de amônia e AGCR foram menores comparado aos animais suplementados com FOS, estes resultados estão de acordo com outros estudos em que Kanakupt et al. (2011) não observaram o aumento desses metabólitos em gatos suplementados com 0,5% GOS, o mesmo pode ser observado em gatos que foram suplementados com uma combinação de 1% GOS+Bifidobacteria (BP-B82) (Biagi et al., 2013).

A suplementação de 0,8% GOS no presente estudo mostrou efeito positivo para a produção de AGVs (acético e propiônico) e maior concentração de lactato, Biagi et al. (2013) também relataram resultados semelhantes onde o ácido acético foi um dos metabólitos mais importantes derivados da fermentação do GOS por *Bifidobacterium spp.*, além disso eles observaram que o aumento do lactato. Porém alguns estudos mostram que houve uma diminuição na concentração de lactato seguido pelo aumento da concentração do butirato (Ogué-Bon et al., 2010), o mesmo efeito observado para esse estudo com a suplementação do FOS, outros autores explicam que pode ter ocorrido a conversão do lactato em butirato por bactérias produtoras de butirato entérico (Belenguer et al., 2006). Os AGCC como o butirato, são a principal fonte de energia para os colonócitos responsáveis por alterações fisiológicas benéficas para o hospedeiro, como a estimulação do apoptose das células (Roediger, 1980). Além disso, a alta concentração de acetato estimula a síntese do ácido butírico por bactérias (Bifidobactérias) e diminuição do ácido acético (Louis et al., 2007) podendo, assim, justificar que no tratamento contendo FOS houve maior concentração de ácido butírico e menores concentrações de ácido acético e lactato, Barry et al. (2010) observaram esse mesmo efeito para gatos suplementados com 4% FOS, o mesmo foi relatado por Kanakupt et al. (2011) com animais suplementados com uma combinação de 0,5% de FOS e 0,5% GOS.

De acordo com Pilla e Suchodolski, (2021) o microbioma fecal de felinos é denominado principalmente pelos filos Firmicutes, em menor proporção os filos Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo. Os filos Firmicutes e Bacteroidota são responsáveis pela

estabilidade da homeostase do trato gastrointestinal, no filo Firmicutes são encontradas, principalmente bactérias gram-positivas (Stojanov et al., 2020) enquanto o filo Bacteroidota é formado pelas bactérias gram-negativas, atuando na modulação do sistema imune (Gilbino et al., 2018). Assim, a razão entre esses filós serve como parâmetro para avaliar mudanças dietéticas da dieta, assim como os coeficientes de digestibilidade (Li & Pan, 2020), nesse estudo não foi observado efeito significativo entre a relação F/B para os tratamentos. Estudo mostra que, a curto prazo, é necessário mudanças drásticas na dieta para observar mudanças na microbiota, indicando que a microbiota é fortemente modulada pela dieta fornecida (Bermingham et al., 2011; Lubbs et al., 2009).

Para o tratamento com a adição de 0,8% de GOS, foi observado maior abundância do gênero *Collinsella*, assim como foi observado maior concentração desse gênero em gatos com diarreias (Suchodolski et al., 2015). O gênero *Collinsella* pertence à família *Coriobacteriaceae* do filo *Actinobacteria*. Bactérias pertencentes a essa família são consideradas como patobiontes e o gênero *Collinsella* é o táxon dominante (Chow et al., 2011). Espécies microbianas específicas como *Collinsella sp.* tem mostrado estar ligado a efeitos pro-inflamatórios (Candela et al., 2016) e pode influenciar no metabolismo lipídico do hospedeiro. Além disso, o gênero *Collinsella* diminui a expressão de proteínas dos enterócitos e estimula maior permeabilidade intestinal (gut leakage) (Chen et al., 2016), esse efeito pode estar correlacionado com a permeabilidade do intestino e com a incidência de uma disbiose, devido à proliferação de bactérias que produzem muito AGV, aumentando a osmolaridade do lúmen intestinal, onde o animal pode apresentar quadros de diarreias. Esse efeito pode ser atribuído ao tratamento com GOS, visto que foi observado um menor escore fecal, Shinohara et al. (2020) observaram que quando gatos adultos receberam 1g/dia de 1-kestose (componente estrutural de frutoligossacarídeo) houve o aumento desse mesmo gênero nas fezes dos felinos alimentados com as dietas, contendo 0,8% de FOS e 0,8% de GOS quando comparado com o tratamento sem a inclusão de prebiótico (Controle Negativo). Esse gênero possui correlação positiva a produção de produtos de fermentação final, sendo um potencial indicador de regulação metabólica pela microbiota induzida pela suplementação de prebióticos (Lyu et al., 2020).

Para a microbiota, a bactéria do gênero *Blautia* apresentou maior abundância para o tratamento com inclusão de 0,8% de GOS, enquanto houve redução para o gênero *Megasphaera*. Bactérias do gênero *Blautia* são consideradas benéficas e correlacionadas

com redução da inflamação e produção de AGCC, principalmente o butirato. O butirato é a principal fonte de energia aos colonócitos, estando associado a prevenção de carcinogênese no cólon. De maneira similar, Lyu et al. (2020), ao avaliar a inclusão de 0,4% de xilooligossacarídeos para gatos, relatou aumento no gênero *Blautia* e diminuição do gênero *Megasphaera*, estimulando, assim, a fermentação intestinal. Para os demais tratamentos, foi observado maior incidência do gênero *Megasphaera*, sendo esse gênero, e o gênero *Roseburia*, considerados principais produtores de butirato, para humanos e gatos. (Geirnaert et al., 2017; Shinohara et al., 2020)

As bactérias Gram-positivas, como as Bifidobactérias e os *Lactobacillus* possuem capacidades de estimular a resposta imune no hospedeiro, assim a inclusão dos prebióticos na dieta podem resultar em efeitos benéficos a saúde do hospedeiro devido a modulação da comunidade microbiana gastrointestinal (Kongnum and Hongpattarakere, 2012). No atual estudo, não houve efeito de tratamento para os parâmetros sanguíneos imunológicos, porém Rentas et al. (2020) observou que a adição do GOS, FOS e um blend de prebióticos demonstrou efeito positivo para o sistema imunológico de cães adultos, devido a capacidade dos prebióticos de impedirem a adesão de patógenos ao muco intestinal. O mesmo estudo conclui que a suplementação de 1% de GOS na dieta melhorou a imunidade dos animais, podendo também dizer isso a inclusão do FOS a 1%, levando-nos a considerar que são necessárias doses maiores de inclusão para observar um efeito significativo nos parâmetros imunológicos (taxa de fagocitose e IgA fecal).

CONCLUSÃO

A inclusão dos prebióticos não alterou de forma significativa os coeficientes de digestibilidade e energia metabolizável. A inclusão do FOS₁ e GOS proporcionou o aumento dos produtos de fermentação final, a qual mostrou uma relação inversa com as variáveis dos indicadores de qualidade fecal e pH fecal.

As dietas experimentais não afetaram a microbiota fecal com relação à sua diversidade, embora táxons específicos tenham sido modulados. O tratamento GOS apresentou a microbiota com maior discrepância dentre todos os tratamentos avaliados, e concentrou a maior parte das modulações taxonômicas. Os tratamentos com prebióticos não apresentaram efeitos sobre a fagocitose de células mononucleares e granulócitos e IgA fecal.

REFERÊNCIAS

- ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Manual Pet Food Brasil 10^a, 2019.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS (AOAC). Official and tentative methods of analysis. Arlington, Virginia: AOAC International, 16.ed., 1995.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. Official Publications 2010. Association of American Feed Control Officials, 2010.
- BARRY KA, WOJCICKI BJ, MIDDELBOSS IS, VESTER BM, SWANSON KS, FAHEY GC. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. *J Anim Sci*. 88: 2978–87, 2010.
- BELENGUER A, DUNCAN SH, CALDER AG, et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microb*;72:3593–3599, 2006.
- BERMINGHAM, EN, KITTELMANN, S, HENDERSON, G, et al. Five-week dietary exposure to dry diets alters the faecal bacterial populations in the domestic cat (*Felis catus*). *Br J Nutr* 106, Suppl. 1, S49–S52, 2011
- CAPORASO, J. G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F. D., COSTELLO E. K., ... & KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336, 2010.
- CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., LOZUPONE, C. A., TURNBAUGH, P. J., ... & KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522, 2011.

- CARCIOFI A.C.; OLIVEIRA L.; VALÉRIO A.; BORGES L.L.; CARVALHO F.; BRUNETTO M.A.; VASCONCELLOS R.S. Comparison of micronized whole soya to common protein sources in dry dog and cat diets. *Animal Feed Science Technology*, v.151, p.251-260, 2009.
- CASE, L.P; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M.G.; RAASCH, M.F. Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professionals. 3rd ed. Mosby, p.13-78, 2011.
- ERWIN, E. S., MARCO, G. J., & EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of dairy science*, 44, 1768-1771, 1961.
- FEDIAF, European Pet Food Industry Federation. Guide to Good Practice for the Manufacturing of Safe Pet Foods, 2020.
- GIBIINO, G., LOPETUSO, L.R., SCALDAFERRI, F., RIZZATTI, G., BINDA, C., GASBARRINI, A. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Dig. Liver Dis.* 50, 635–639, 2018.
- HAMER HM, DE PRETER V, WINDEY K, VERBEKE K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302:G1–9, 2011.
- HOUDIJK JGM. Effects of non-digestible oligosaccharides in young pig diets. PhD Diss. Wageningen: Wageningen Univ.; 1998.
- KANAKUPT K, VESTER BOLER BM, DUNSFORD BR, et al. Effects of shortchain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adults cats. *J Anim Sci* 89:1376–1384, 2011.
- KONGNUM, K., HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immun.* 32, 170-177, 2012.

- LAFLAMME, D.P. Development and validation of a bodycondition score system for dogs. *Canine Practice*, v.22, p.10-15, 1997.
- LI, Q., PAN, Y. Differential Responses to Dietary Protein and Carbohydrate Ratio on Gut Microbiome in Obese vs. Lean Cats. *Front. Microbiol.* 11, 1–12, 2020.
- LOUIS, P., SCOTT, K. P., DUNCAN, S. H., & FLINT, H. J. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1197–1208, 2007
- LUBBS, DC, VESTER, BM, FASTINGER, ND, et al. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *J Anim Physiol Anim Nutr* 93, 113–12, 2009.
- LYU, Y., DEBEVERE, S., BOURGEOIS, H., RAN, M., BROECKX, B.J.G., VANHAECKE, L., WIELE, T. VAN DE, HESTA, M. Dose-Dependent Effects of Dietary Xylooligosaccharides Supplementation on Microbiota, Fermentation and Metabolism in Healthy Adult Cats. *Molecules* 25, 5030, 2020.
- NAKAE, T., & ELLIOTT, J. A. Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. *Journal of Dairy Science*, 48, 293–299, 1965.
- OGUÉ-BON E, KHOO C, MCCARTNEY AL, et al. In vitro effects of synbiotic fermentation on the canine faecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 73:587–600, 2010.
- PARVANEH, K., JAMALUDDIN, R., KARIMI, G., & ERFANI, R. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. *TheScientificWorldJournal*, 595962, 2014.
- PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The gut microbiome of dogs and cats, and the influence of diet. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 51, n. 3, p. 605-621, 2021.
- PROPST L, FLICKINGER EA, BAUER LL, MERCHEN NR, FAHEY GC. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on

- nutriente digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *J Anim Sci.*;81:3057–66, 2003.
- PRYCE, J. D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst*, v. 94, n. 1125, p. 1151-1152, 1969.
- RENTAS, M. F. et al. Galactoligosaccharide and a prebiotic blend improve colonic health and immunity of adult dogs. *PLoS One*, v. 15, n. 8, p. e0238006, 2020.
- ROEDIGER, W. E. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21, 793–798, 1980.
- SANTOS, J. P. F. et al. Effects of dietary yeast cell wall on faecal bacteria and fermentation products in adult cats. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v. 102, n. 4, p. 1091-1101, 2018.
- SCOTT KP, GRATZ SW, SHERIDAN PO, FLINT HJ, DUNCAN SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res.*69:52–60, 2013.
- SHINOHARA, M., KIYOSUE, M., TOCHIO, T., KIMURA, S., KOGA, Y. Activation of butyrate-producing bacteria as well as bifidobacteria in the cat intestinal microbiota by the administration of 1-kestose, the smallest component of fructooligosaccharide, *J. Vet. Med. Sci.* 82, 866–874. 2020
- STOJANOV, S., BERLEC, A., ŠTRUKELJ, B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* 8, 1–16, 2020.
- SUCHODOLSKI, J.S., FOSTER, M.L., SOHAIL, M.U., LEUTENEGGER, C., QUEEN, E. V., STEINER, J.M., MARKS, S.L. The Fecal Microbiome in Cats with Diarrhea. *PLoS One* 10, e0127378, 2015.
- VITAL M, GAO J, RIZZO M, et al. Diet is a major factor governing the fecal butyrate-producing community structure across Mammalia, Aves and Reptilia. *Isme* 2015;9(4):832–43.
- WILCOXON, F. Individual comparisons by ranking methods. In: *Breakthroughs in statistics*. Springer, New York, NY. p. 196-202, 1992.

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. D643-D648, 2014.

ZENTEK J, MARQUAT B, PIETRZAK T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. *J Nutr.* 2002; 132 (6): 1682–1684.