



**EXTRATO SECO DE PAREDE DE LEVEDURA  
EM DIETAS PARA GATOS ADULTOS**

**ADRIANA AUGUSTO AQUINO**

**2009**

**ADRIANA AUGUSTO AQUINO**

**EXTRATO SECO DE PAREDE DE LEVEDURA EM DIETAS PARA GATOS  
ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora:

Profa. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Aquino, Adriana Augusto.

Extrato seco de parede de levedura em dietas para gatos adultos.  
/ Adriana Augusto Aquino. – Lavras : UFLA, 2009.

171 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.

Bibliografia.

1. Mananoligossacarídeo. 2. Prebiótico . 3. Felinos. 4. Dieta úmida.  
5. Dieta seca. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.80852

**ADRIANA AUGUSTO AQUINO**

**EXTRATO SECO DE PAREDE DE LEVEDURA EM DIETAS PARA GATOS  
ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 26 de março de 2009.

Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi	UNESP-Jaboticabal
Prof. Dr. Carlos Artur Lopes Leite	DMV- UFLA
Prof. Dr. Roberto Maciel de Oliveira	DZO-UFLA
Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini	DZO-UFLA

Profa. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2009

## *Dedico*

A quem sacrificou vontades e aspirações em prol de minha realização e bem-estar.

A quem trabalhou arduamente para que o fruto de seu trabalho fosse a base para que o meu começasse.

A quem, mesmo que com gestos disfarçados e implicâncias bobas, sabe demonstrar o quanto deseja minha felicidade.

Aos que reforçaram a importância do amor, do respeito e da amizade.

A minha mãe Roseli, meu pai Vicente, meu irmão Alexandre, minha avó Darcy, minha tia Ivette, meus avós Maria, Waldomiro e Waldemar (*in memoriam*), meu amigo/pai/irmão Cleube, a todos que fazem parte de minha vida e a Deus, por ter me concedido o direito a ela.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades de crescimento e de aprendizado sempre.

Aos meus pais, Roseli e Vicente, por estarem sempre presentes, seja por meio de uma ligação telefônica, um pensamento ou um batimento cardíaco acelerado; por possibilitarem o meu crescimento pessoal e profissional, muitas vezes em detrimento de sonhos próprios e às custas de esforços hercúleos e por me fazerem entender que a distância é apenas um limite físico ínfimo, facilmente transponível pelo amor. Amo vocês!

Ao meu irmão, Alexandre, que me traz diariamente exemplos de bravura e coragem e que me ensina a enxergar a vida sob diversos ângulos, por vezes mais sensatos e racionais do que os meus. Amo você.

A minha avó Darcy e a minha tia Ivette, cujo carinho é conforto e aconchego; é a certeza de luz, mesmo em dias nublados e frios.

Aos meus avós, Maria, Waldomiro e Waldemar (*in memoriam*), que estiveram sempre presentes, quando em vida, torcendo para que a felicidade e a realização fossem constantes em minha trajetória e que hoje, mesmo na ausência física, mostram-se mais presentes do que nunca em meu coração, trazendo-me doses diárias de força, ânimo e luz. Mais do que a razão de minha existência, vocês são a inspiração para a minha permanência.

A Universidade de São Paulo, por ter possibilitado a realização do mestrado e os primeiros passos de minha carreira na academia, em especial à professora Catarina Abdalla Gomide, por me auxiliar com as análises bromatológicas.

À Universidade Federal de Lavras, por me receber para a realização do doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e à Alltech, pelo financiamento deste projeto

A Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, pela oportunidade, pelos desafios, pela compreensão e confiança; por mostrar-me, por meio de seu exemplo, que, mesmo diante das dificuldades e dos desafios que a vida nos impõe, nada é melhor do que voltar os olhos para o passado e observar o quanto tivemos que lutar para estar aqui. Isso nos dá ainda mais força e coragem, qualidades fundamentais a quem pensa em trilhar caminhos árduos, mas recompensadores. Agradeço pelos momentos que me provaram que apostar tudo na certeza do que queremos, ou seja, que investir em determinação, é ganhar sempre! Muito obrigada!

Aos meus coorientadores, professor Carlos Artur Lopes Leite, professor Antônio Gilberto Bertechini e professora Priscila Vieira Rosa Logato. Ao Cacá, pela participação intensa neste trabalho de pesquisa, por me fazer resgatar o gosto pelas outras áreas da medicina veterinária; ao Bertechini, pela paciência de minhas limitações frente a sua genialidade, pela leitura dos projetos e pelos ensinamentos nas disciplinas; a Priscila, por acreditar em mim e pelos incentivos sem os quais seria mais difícil esta longa caminhada.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária, em especial às professoras Gabriela e Suely e ao professor Christian, por dedicar parte de seu tempo a esclarecer dúvidas e pela disposição em colaborar com o nosso trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial ao professor Tarcísio.

Ao professor Eduardo Alves e a Eloísa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia, pela organização, prestatividade e colaboração que fazem deste local de trabalho uma referência.

A Izabella, Willer (cirurgia), Anelise, Denise, Maurício, Juliana (diagnóstico por imagem), à médica veterinária Lydia (colonoscopista), Bruno Antunes Soares (histologia) e funcionários do Hospital Veterinário, por auxiliarem na realização das análises colonoscópicas, na interpretação das lâminas de histologia e das radiografias e imagens ultrassonográficas.

A Lígia, Livinha e João Marcelo, que estiveram presentes na primeira fase experimental, contribuindo com o seu trabalho e perdendo várias noites de sono conosco. Sem vocês seria tudo mais difícil!

Ao Departamento de Ciências dos Alimentos e aos funcionários do Laboratório de Microbiologia, por contribuírem com parte desta pesquisa.

À professora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela disponibilidade habitual, atenção, paciência e auxílio, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho. Mas, mais ainda, pela convivência em poucos, mas suficientes momentos, que me provam a cada dia que para ser um bom professor e orientador é necessário mais que conhecimento técnico-científico. É também preciso ter sensibilidade. Obrigada, professora, por tornar isso ainda mais claro e por ser a personificação

de algo que eu li e com que concordo plenamente: “Ser professor é poder aplicar o amor na sua mais expressiva manifestação de sublimidade. É fazer brilhar no íntimo de cada aluno a chama sagrada que o criador ali depositou”.

Ao professores Aulus Cavalieri Carciofi, Eduardo Pinto Filgueiras e Roberto Maciel de Oliveira, pela participação nas bancas de qualificação e/ou defesa. Ao professor Aulus, pela contribuição imensurável, a gentileza habitual e os questionamentos bem colocados que me estimularam a buscar me aperfeiçoar mais. Ao professor Eduardo, pela gentileza, confiança e prontidão em colaborar conosco. Ao professor Roberto, por ter aceitado nosso convite.

Ao professor Márcio Gilberto Zangerônimo, pelas valiosas dicas e auxílio com a análise dos dados, que foram fundamentais na fase final de redação deste trabalho.

Ao professor Marcos Veiga dos Santos, orientador e amigo, que me ensinou muito sobre o que é ser um bom professor e pesquisador. Modelo sem o qual seria impossível adquirir grande parte dos conhecimentos profissionais e pessoais que hoje formam o alicerce para a construção de meu futuro. Mais uma vez, meus profundos agradecimentos.

Ao amigo Cleube Boari, por reforçar em mim, todos os dias, o significado de amor, respeito, carinho, amizade, leveza e alegria. Alguém por quem tenho admiração imensa e que me inspira a ser melhor a cada dia. Sem as nossas conversas, nossas dúvidas e certezas, nossos choros e gargalhadas, nossas incertezas e convicções, eu não teria aprendido tanto. Além de toda a lição de vida que me passa é, ainda, um exemplo de profissional dedicado às atividades acadêmicas e cuja determinação e comprometimento são inspirações constantes

a quem também sonha em trilhar esses caminhos. É uma daquelas pessoas que parece que a gente conhece desde sempre, desde antes de conhecer. Uma prova da existência dos anjos. Meu irmão amado, muito obrigada por tudo!

À amiga Mariana Alves, pelos momentos compartilhados, pela vontade contagiante e pelo auxílio. Por ter me ensinado que as amizades são muito mais importantes do que as dificuldades e que a perseverança é o melhor presente que podemos nos dar. Além disso, devo agradecer pelo auxílio fundamental para a realização das análises microbiológicas dos experimentos. Mari, muito obrigada!

À amiga Adriana Brasil, pela companhia sempre benfazeja, seja para momentos de descontração após trabalho árduo ou encontros para discussões sempre produtivas que geraram e, tenho certeza, que continuarão gerando bons frutos. Também pelas palavras de ânimo, consolo e, acima de tudo, pela amizade.

Às amigas Cecília e Michele, por todas as nossas andanças, mesmo aquelas em que não precisávamos sair do lugar para visitar os locais mais agradáveis. Pelas risadas, pelos papos sérios, pela troca de experiência que somou e soma muito à minha riqueza particular, meus amigos. Obrigada, por fazerem parte disso tudo!

Ao amigo Lucas, pelo companheirismo e momentos agradáveis pelos quais passamos; por me aproximar do belo, seja por meio da imagem de uma deslumbrante orquídea ou de um verso de Florbela Espanca e pela sensibilidade, sem a qual não seríamos tão humanos! Obrigada, amigo.

Ao Marcus e à amiga Tatiana. Ao Marcus, por possibilitar o estudo da melhor matéria que pode existir para qualquer ser humano: o autoconhecimento. Mesmo frente a todas as dificuldades e ilusões, esse foi o resultado mais concreto e

valioso que pude obter. Agradeço-lhe também por ter feito parte de nossa pequena grande equipe neste trabalho. À Tatiana, pela paciência e serenidade de sempre que me ajudaram a manter a calma, mesmo nos momentos turbulentos e pela colaboração para que este trabalho se realizasse.

À Janine França, por contribuir para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, obrigada!

Ao amigo João Paulo, pela companhia de trabalho indispensável, pela presença constante e pela contribuição imensurável neste e em outros trabalhos. Pelas discussões um tanto quanto filosóficas que me mostraram muito sobre a vida e sobre mim mesma. Muito obrigada por estar sempre perto

Aos alunos Maria Cláudia e Rodrigo Ferrazza, pela confiança e por estarem sempre comigo, mesmo nos momentos em que eu não pude estar mais presente auxiliando-os e orientando-os. Agradeço imensamente pela confiança e registro que essa relação de credibilidade e respeito é motivo mais que suficiente para que eu continue lutando. Aproveito para fazer um agradecimento especial a todos os alunos com que tive o privilégio de conviver como professora e com os quais aprendi muito. Muito obrigada!

Aos companheiros do NENAC, em especial ao Gustavo Maia, Natália Charleaux e Rosana Silva, pelas risadas, momentos agradáveis e aprendizado mútuo.

Aos colegas de pós-graduação desta Universidade, em especial Júlio Carvalho e Lívia Martinez, que estiveram sempre presentes tornando essa minha estadia em Lavras um dos momentos mais agradáveis de toda minha vida.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre, Camila Marsola, Renata Molina, Luciana Martins, tia Rosa e Jorge, pela torcida, paciência e, especialmente, por acreditarem na beleza da afinidade.

A todos os meus familiares (tios, primos...) e amigos (Bruno Botaro, Raquel Fernandes, Carla Balzano, Camilla Silveira...) que, por um motivo ou outro estejam distantes, mas que participaram de forma importante na construção de minha história. Meus sinceros agradecimentos.

Aos animais, sem os quais não teria escolhido seguir por essa estrada e que renovam, a cada dia, o meu desejo de seguir mais adiante. Exemplos concretos do que, se analisados superficialmente, parecem tão abstratos: o amor incondicional. Aos meus animais (Flocks, Fofucha, Ariel- *in memoriam*- Mel e Dana) e a todos que cederam parte de suas vidas para que meus trabalhos se realizassem. Devo agradecer também a um acontecimento triste, mas que me ensinou muito sobre amor e comprometimento com a vida. Para muitos, apenas mais um gatinho em meio a tantos outros... Para mim, a certeza de que devemos lutar sempre pela continuidade da vida, mesmo quando ela se esvai por entre os dedos tão rápido quanto um raio de luz... Obrigada pela companhia, pelos miados, pelos suspiros e até pelas lágrimas que derramei... Porque você, gatinho, me ensinou muito... algo profundo e verdadeiro... aprendizado sublime e efetivo... Certeza de que tudo muda em um segundo, que somos grãos de areia e que momentos rápidos e mutantes como esses vêm mostrar... Eu tinha mesmo que estar lá... E estava!... Muito obrigada, anjinho... E descanse em paz!

*Aos que me ensinaram a importância de ver além do que os  
olhos enxergam*

"Foi e é muito bom!  
Mas, será ainda melhor...  
A distância do que está tão próximo  
Amedronta e desanima  
Mas, apenas quando não se vê a proximidade do que era distante  
Se há algum tempo fosse  
Lágrimas rolariam e o pranto se dissiparia  
Mas, não mais  
Não agora que o ângulo é distinto e a vista perfeita  
Não basta ter olhos para ver ou ouvidos para ouvir  
É necessário ter um coração... Um grande e ativo coração...  
Para entender a simplicidade do que a primeira vista parece tão complexo  
Obrigada, meu Deus, por absolutamente tudo!"

"Possuímos em nós mesmos, pelo pensamento e a vontade, um poder de ação  
que se estende muito além dos limites de nossa esfera corpórea."

**Allan Kardec**

"O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes não tivesse tentado  
atingir o impossível."

**Max Weber**

## **BIOGRAFIA**

Adriana Augusto Aquino, filha de Vicente Roberto Saloti de Aquino e Roseli Neves Augusto Aquino nasceu em Guarulhos, SP.

Em fevereiro de 1998, ingressou na Universidade Guarulhos e, em fevereiro de 2003, obteve o título de médica veterinária.

Em março de 2004, iniciou o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade de São Paulo, SP, tendo concentrado seus estudos na área de Nutrição Animal.

Em fevereiro de 2006, submeteu-se à defesa de dissertação para a obtenção do título de “Mestre”.

Em março de 2006, foi aprovada no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, tendo concentrado seus estudos na área de Nutrição de Monogástricos.

Em março de 2009, submeteu-se à defesa de tese para a obtenção do título de “Doutora”.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição centesimal aproximada dos subprodutos de levedura.....	4
TABELA 2	Composição da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
TABELA 3	Diferenciação de alguns gêneros de enterobactérias pelo IMViC .....	43
TABELA 4	Gradações de escore fecal em nutrição de cães e gatos .....	63
TABELA 5	Composição química analisada (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica* do alimento úmido .....	68
TABELA 6	Níveis de garantia (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica* do alimento úmido na fase de adaptação.....	84
TABELA 7	Níveis de garantia (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica* do alimento úmido na fase de coleta .....	84
TABELA 8	Composição química analisada (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica* do alimento seco .....	88
TABELA 9	Valores de pH, de bactérias ácido-láticas (log UFC/g de matéria original) e de clostrídio sulfito redutor (log UFC/g de matéria original) das fezes dos gatos.....	97
TABELA 10	Consumo de nutrientes (g/dia) e de energia (kcal/dia).....	99
TABELA 11	Coefficientes de digestibilidade de nutrientes e da energia.....	100
TABELA 12	Energia digestível (kcal/kg) das dietas na matéria seca e na matéria natural.....	102

TABELA 13	Medidas de escore fecal* em função do teor de extrato de parede de levedura na dieta.....	103
TABELA 14	Distribuição percentual do escore fecal das amostras obtidas dos gatos em função dos níveis crescentes de EPL na dieta.....	104
TABELA 15	Valores de mediana e intervalo de confiança (95%) do escore para aspecto da mucosa intestinal por avaliação colonoscópica.....	105
TABELA 16	Morfologia intestinal (número de colonócitos e células caliciformes) dos gatos alimentados com e sem EPL na dieta.....	111
TABELA 17	Espessura da parede intestinal (mm) dos gatos em função dos níveis crescentes de EPL na dieta.....	113
TABELA 18	Área de gás intestinal (cm <sup>2</sup> ) e escore de gás das radiografias dos gatos em função do nível de EPL da dieta.....	115
TABELA 19	Consumo (g) e consumo na matéria seca (g) de dietas com ou sem a adição de extrato seco de parede de levedura.....	116
TABELA 20	Distribuição percentual das colônias isoladas nas placas de eosina-azul de metileno (EMB).....	120
TABELA 21	Contagem total de bactérias do ácido-lático, enterobactérias e <i>E. coli</i> em log/g de fezes na matéria original.....	123
TABELA 22	Concentração de ácidos graxos de cadeia curta em µmol/g de matéria seca de fezes.....	125
TABELA 23	Concentração de nitrogênio amoniacal (mg%) e escore para odor de fezes em função dos tratamentos.....	126

TABELA 24	Consumo de nutrientes (g/dia) e de energia (kcal/dia) dos gatos em função do teor de EPL da dieta.....	129
TABELA 25	Coeficientes de digestibilidade de nutrientes e da energia em função dos níveis de extrato seco de parede de levedura na dieta. ....	130
TABELA 26	Energia digestível e metabolizável corrigida (kcal/kg) das dietas na matéria seca e na matéria natural em função dos teores de EPL na dieta.....	132
TABELA 27	Medidas de escore fecal em função do nível de EPL na dieta.....	133
TABELA 28	Distribuição percentual do escore fecal das amostras obtidas dos gatos em função dos teores de EPL na dieta. ....	134

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	N-glicosilação na levedura.....	8
FIGURA 2	Esquematização da estrutura da parede celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Na figura, não há distinção entre os glucanos com ligações beta 1,6 ou beta 1,3.....	9
FIGURA 3	Lâmina histológica de cólon canino (hematoxilina/eosina) evidenciando as características teciduais e celulares.....	11
FIGURA 4	Principais microrganismos do cólon de felinos.....	17
FIGURA 5	Fermentação alternativa para a formação de butirato (1) e propionato (2-4). 1 a. via butiril CoA transferase, 1b . via butirato quinase; 2. via acrilato; 3. via succinato; 4. via propanodiol. As linhas hachuradas indicam intermediários. DHAP, diidroxiacetona fosfato; P, fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato .....	27
FIGURA 6	Formação de butirato a partir do lactato .....	28
FIGURA 7	Principais produtos oriundos da fermentação bacteriana no intestino grosso. 1,bactérias entéricas fermentadoras de butanediol ( <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> ); 2, <i>Shigella</i> ; 3, <i>Clostridium</i> ; 4, bactérias entéricas fermentadoras ácido mistas ( <i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> ); 5, bactérias propiônicas ( <i>Bifidobacterium</i> ); 6, bactérias que utilizam o ácido láctico convertendo-o em acético ( <i>Bifidobacterium</i> ); 7- bactérias butíricas ( <i>Eubacterium</i> ).....	32
FIGURA 8	Imagem fotográfica da radiografia do animal 2 com marcação referente a distância de 1cm.....	77

FIGURA 9	Imagem fotográfica da radiografia do animal 2 com a marcação das áreas de gás (áreas radiotransparentes) realizadas no programa Paint <sup>®</sup> .....	78
FIGURA 10	Imagem fotográfica da radiografia do animal 2 após o recorte das áreas de gás .....	78
FIGURA 11	Imagem da radiografia após a seleção de uma das áreas de gás coladas à direita da figura com a ferramenta Wand tool do Image J <sup>®</sup> .....	80
FIGURA 12	Imagem ultra-sonográfica evidenciando as camadas da parede intestinal do cólon do animal (círculo) e as mensurações da espessura desta em milímetros.....	81
FIGURA 13	Questionário submetido aos voluntários para realização do teste sensorial com as amostras de fezes dos gatos .....	94
FIGURA 14	Mucosa da fêmea 9 pertencentes ao tratamento de 0,6% de EPL, onde observa-se áreas eritematosa difusas e edema (escore 3). .....	106
FIGURA 15	Corte transversal do cólon do macho 5, que recebeu o tratamento controle. Aumento 40 x.....	108
FIGURA 16	Corte histológico do cólon da fêmea 8, que recebeu o tratamento 2 (com suplementação de 0,2% de EPL). Aumento 40 x.....	108
FIGURA 17	Corte histológico do cólon do macho 9, que recebeu o tratamento 3 (com suplementação de 0,4% de EPL). Aumento 40 x.....	109

FIGURA 18	Corte histológico do cólon da fêmea 9, que recebeu o tratamento 4 (com suplementação de 0,6% de EPL). Nota-se no campo superior esquerdo (seta) e em pontos difusos da lâmina a infiltração de hemácias no tecido, confirmando as alterações morfológicas visualizadas na colonoscopia. Aumento 40 x.....	109
FIGURA 19	Vista eletromicrográfica das mucosas do cólon dos gatos submetidos a dietas sem e com extrato seco de parede de levedura. (A) macho 9 (tratamento 3); (B) macho 7 (tratamento 2); (C) e (D) macho 2 (controle).....	112
FIGURA 20	Associação de escore e área de gás em cm <sup>2</sup> .....	114
FIGURA 21	Colônias isoladas nas placas de EMB por ordem de enumeração da esquerda para a direita: 1 a 11.....	119
FIGURA 22	Teste de IMViC. (A) à esquerda (tubo verde), teste citrato negativo; (B) Voges Proskauer negativo; (C) à esquerda (anel róseo) indol positivo; (D) à esquerda (tubos vermelhos), teste de vermelho de metila positivo. ....	121
FIGURA 23	Bastonetes Gram-negativos correspondentes à colônia número 3. ....	122
FIGURA 24	Bactérias lácticas isoladas no MRS .....	122

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Extrato seco de parede celular de levedura.....	3
2.2 Constituição da parede celular da levedura .....	4
2.2.1 Porção mais interna da parede: 1,3 beta glucano e quitina .....	4
2.2.2 Porção mais externa da parede: as manoproteínas.....	6
2.3 Características morfológicas e funcionais do intestino grosso .....	10
2.4 Microbiota intestinal .....	14
2.4.1 Características gerais .....	15
2.4.2 Principais gêneros de bactérias presentes na microbiota do intestino grosso.....	16
2.4.3 Adesão .....	20
2.4.4 Nutrição bacteriana e produtos finais de fermentação .....	24
2.4.5 Fatores que interferem no estabelecimento da microbiota.....	32
2.5 Cultivo laboratorial de microrganismos.....	38
2.6 Efeitos dos ácidos graxos de cadeia curta sobre a morfologia intestinal .....	44
2.7 Modulação da microbiota intestinal pelo extrato de parede de levedura .....	48
2.8 Extrato seco de parede de levedura e efeitos secundários sobre os sistemas fisiológicos .....	54
2.8.1 pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta .....	54
2.8.2 Volume de produção de gás.....	56
2.8.2.1 Metodologias para mensuração de gás intestinal.....	56
2.8.2.2 Extrato seco de parede de levedura e produção de gás .....	57
2.8.3 Morfologia intestinal.....	58

2.8.3.1 Técnicas para a coleta de material e avaliação da morfologia intestinal.....	58
2.8.3.2 Extrato seco de parede de levedura e morfologia intestinal.....	59
2.8.4 Extrato seco de parede de levedura, digestibilidade dos nutrientes e escore fecal .....	60
2.8.4.1 Digestibilidade dos nutrientes e da energia .....	60
2.8.4.2 Escore fecal.....	62
2.8.5 Redução de odor de fezes .....	64
2.8.6 Outras atuações.....	65
2.8.7 Extrato seco de parede de levedura e palatabilidade.....	65
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	67
3.1 Experimento 1.....	67
3.1.1 Local, instalações e delineamento experimental.....	67
3.1.2 Coleta de amostras .....	69
3.1.2.1 Exames radiográficos e ultra-sonográficos .....	69
3.1.2.2 Colonoscopia e biópsias intestinais .....	70
3.1.3 Metodologias para análises.....	72
3.1.3.1 Determinação do pH das fezes.....	72
3.1.3.2 Análises microbiológicas.....	72
3.1.3.3 Análises bromatológicas e cálculos da energia metabolizável e dos coeficientes de digestibilidade .....	73
3.1.3.4 Análises histológicas.....	75
3.1.3.5 Preparação de stubs para microscopia eletrônica.....	76
3.1.3.6 Análises radiográficas e ultra-sonográficas .....	76
3.1.4 Análises estatísticas .....	81
3.2 Experimento 2.....	82
3.2.1 Procedimento experimental .....	82
3.2.2 Análises estatísticas .....	85

3.3 Experimento 3.....	86
3.3.1 Local, instalações e delineamento experimental.....	86
3.3.2 Coleta de amostras.....	88
3.3.3 Análises microbiológicas.....	88
3.3.4 Determinação do nitrogênio amoniacal.....	90
3.3.5 Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	90
3.3.6 Teste sensorial.....	92
3.3.7 Análises estatísticas.....	93
3.4 Experimento 4.....	95
3.4.1 Protocolo experimental.....	95
3.4.2 Coleta de amostras.....	95
3.4.2.1 Dietas e fezes.....	95
3.4.3 Metodologias para análises.....	96
3.4.3.1 Análises bromatológicas e cálculos da energia digestível e dos coeficientes de digestibilidade.....	96
3.4.3.2 Análises estatísticas.....	96
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
4.1 Experimento 1.....	97
4.1.1 pH e grupos bacterianos fecais.....	97
4.1.2 Digestibilidade de nutrientes, de energia e escore fecal.....	99
4.1.3 Morfologia intestinal.....	104
4.1.3.1 Avaliação da mucosa intestinal por colonoscopia.....	104
4.1.3.2 Lâminas histológicas e stubs de microscopia eletrônica.....	107
4.1.3.3 Imagens ultra-sonográficas.....	113
4.1.4 Produção de gás intestinal (Imagens radiográficas).....	113
4.2 Experimento 2.....	116
4.2.1 Consumo.....	116
4.2.2 Razão de ingestão.....	118

4.3 Experimento 3.....	118
4.3.1 Microbiologia das fezes, água e dietas .....	118
4.3.1.1 Caracterização e frequência de distribuição das colônias nas fezes .....	118
4.3.2 Ácidos graxos de cadeia curta .....	124
4.3.3 Redução de odor de fezes e nitrogênio amoniacal.....	126
4.4 Experimento 4.....	128
4.4.1 Digestibilidade de nutrientes e escore fecal.....	128
5 CONCLUSÃO .....	135
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

## RESUMO

AQUINO, Adriana Augusto. **Extrato seco de parede de levedura em dietas para gatos adultos**. 2009. 171p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Com o objetivo de avaliar o efeito do extrato seco de parede de levedura (EPL) para felinos domésticos, quatro ensaios experimentais foram conduzidos no Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia (CENAC) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. No primeiro, 20 gatos adultos foram distribuídos ao acaso em quatro tratamentos: dieta comercial úmida (controle) e controle + 0,2%, 0,4% ou 0,6% de EPL na matéria seca. No ensaio 2, de palatabilidade, 20 gatos adultos receberam simultaneamente dieta comercial úmida, sem e com a inclusão de 0,4% de EPL. No terceiro e no quarto ensaios, utilizaram-se alimento seco e as mesmas doses e delineamento do primeiro ensaio. Os resultados foram avaliados por regressão polinomial simples ou teste de Kruskal Wallis (scores). No experimento 1, não foram observadas diferenças quanto à contagem total de bactérias do ácido lático e do grupo clostrídio sulfito redutor, área de gás em alças intestinais, espessura da parede do cólon, digestibilidade de nutrientes, energia e escore fecal. No entanto, houve alteração nas características de mucosa observadas por colonoscopia. No ensaio 2, observou-se efeito negativo da inclusão de 0,4% de EPL sobre a palatabilidade das dietas ( $p=0,0043$ ). No terceiro, o número de bactérias lácticas, enterobactérias e *E. coli*, bem como a concentração de nitrogênio amoniacal não foram alteradas, embora o nível de 0,2% tenha sido efetivo em melhorar o odor das fezes. As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta não se modificaram em função dos tratamentos. Já no experimento 4, houve efeito quadrático no consumo de matéria seca e aumento linear ( $p=0,0465$ ) sobre o coeficiente de digestibilidade da matéria seca. Dessa forma, pode-se concluir que a inclusão de EPL em dietas úmidas não foi efetiva em alterar os parâmetros avaliados e que foi capaz de diminuir a palatabilidade e que em dietas secas há um potencial para a melhora da digestibilidade da matéria seca e da redução de odor de fezes. Em nenhum dos ensaios houve modificação na concentração dos grupos bacterianos estudados, no entanto, um estudo mais amplo da microbiota fecal é recomendado. Assim, novas pesquisas são necessárias para compreender o mecanismo de ação e as doses adequadas do extrato seco de parede de levedura para felinos.

---

Comitê Orientador: Flávia Maria de Oliveira Borges Saad (Orientadora)-DZO/UFLA,  
Priscila Vieira Rosa Logato-DZO/UFLA, Antônio Gilberto Bertechini-  
DZO/UFLA

## ABSTRACT

AQUINO, Adriana Augusto. **Spray-dried yeast cell wall in diets for adult cats**. 2009. 171p. Thesis (Doctorated in Animal Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The aim of this research was to evaluate the effects of spray-dried yeast cell wall (YCW) for feline. Four trials were carried out at the Animal Science Department of Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais: in the first experiment, 20 adult cats were randomized in four treatments: wet commercial diet (control) and control plus 0.2, 0.4 or 0.6% of YCW in dry matter. In the second experiment, about palatability, 20 adult cats received at the same time a wet diet with or without 0.4% YCW supplementation. The third and fourth experiments used a commercial dry diet and equal arrangement, concentration of YCW and number of animals of the first trial of this research. The results were analysed by regression or Kruskal Wallis test (score measures). In experiment 1, no differences were showed for microbiology of feces, gas areas, colon wall thickness, nutrient and energy digestibilities and score of feces. However, an effect on mucosal characteristics in colonoscopy was found in treatment 4. In second trial, there were a negative effect of 0.4% YCW inclusion ( $p=0.0043$ ) on palatability of diets. In the third experiment there weren't effects on microbiology of feces and amoniacal nitrogen. However, 0.2% YCW supplementation was effective to improve odour of feces. Concentrations of short chain fatty acids were not changed by yeast cell wall. In fourth experiment, there were a quadratic effect on feed intake and a positive linear effect on dry matter digestibility ( $p=0.0465$ ). Thus, the YCW supplementation in wet diet was not effective and in dry diets can be important to improve dry matter digestibility and to have an ameliorating effect on odour of feces. However, it can be decrease palatability in both diets. No effects were showed in all microorganisms studied, but it is very important to study other groups of microbiota. New researches are necessary to understand the mechanisms of action and adequate doses of YCW for adult cats.

---

Guidance Committee: Flávia Maria de Oliveira Borges Saad-DZO/UFLA (Major Professor), Priscila Vieira Rosa Logato- DZO/UFLA and Antônio Gilberto Bertechini-UFLA/DZO

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de aditivos tem sido bastante discutido na nutrição animal, nos últimos anos. Seus principais objetivos seriam melhorar o desempenho das criações e/ou substituir substâncias como antibióticos e anticoccidianos, melhorando a imunidade de forma natural. A justificativa para a preocupação com as defesas orgânicas é que a resistência microbiana tem se tornado um sério problema na medicina e na agricultura e pressões sociais levaram à criação de regulamentos para restringir a sua utilização (Tellez et al., 2006). Dessa forma, estratégias nutricionais para minimizar os efeitos do estresse e de infecções têm sido propostas.

Para os animais de estimação, o conceito assemelha-se ao aplicado em seres humanos. Na medicina, o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, gera a necessidade de produção de novos conhecimentos científicos e de tecnologias que resultem na maximização das funções fisiológicas de cada indivíduo, assegurando seu bem-estar e saúde. Também neste cenário, a nutrição desempenha papel fundamental e os ingredientes funcionais (como os prebióticos) são alternativas para possibilitar o alcance desses objetivos.

De forma semelhante, a manutenção da saúde e do bem-estar dos animais de estimação adquiriu significado bastante especial nos últimos anos, após o estreitamento de sua relação com os proprietários. Isso porque a vida nos grandes centros urbanos levou as pessoas a habitarem lugares cada vez menores e os cães e os gatos assumiram papel importante na prevenção de situações de estresse e melhora na qualidade de vida dos proprietários. Neste caso, oferecer nutrição adequada aos animais de companhia pode funcionar como uma

importante medida de saúde preventiva que leva, em muitos casos, ao aumento da longevidade.

Neste contexto, os prebióticos assumem lugar de destaque. Eles podem ser definidos como ingredientes não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de uma ou mais bactérias benéficas intestinais, melhorando a saúde do animal (Gibson & Roberfroid, 1995). Muitos prebióticos têm sido estudados e descritos e, dentre eles, destaca-se o mananoligossacarídeo (MOS).

O MOS está localizado na porção mais externa da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e contribui com cerca de 50% da fração carboidrato desta. Tem demonstrado capacidade de modular a microbiota intestinal e, dessa forma, poderia levar a uma série de benefícios decorrentes da seleção bacteriana, tais como produção de ácidos graxos de cadeia curta, melhora no fluxo sanguíneo intestinal e na digestibilidade de nutrientes, redução de odor de fezes e imunomodulação, entre outros.

No entanto, embora tenham sido realizados estudos nos quais são avaliados os seus efeitos em diversas espécies, inclusive cães, faltam informações a respeito dos níveis a serem utilizados, bem como sobre os efeitos de seu fornecimento para gatos domésticos.

Devido à importância do quadro exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de teores crescentes de extrato seco de parede de levedura (0%, 0,2%, 0,4% e 0,6% na matéria seca da dieta) para gatos adultos sobre: digestibilidade dos nutrientes, grupos bacterianos fecais, características morfológicas do cólon, concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta e de nitrogênio amoniacal, redução de odor de fezes e palatabilidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Extrato seco de parede celular de levedura

No Brasil, a biomassa de levedura tem sido produzida em três setores: o sucroalcooleiro, como subproduto do etanol, o cervejeiro e o de panificação (Chaud et al., 2007). Ela pode ser utilizada não apenas com finalidade tecnológica na produção de alimentos, mas também com o objetivo de promover a saúde intestinal e sistêmica de quem a consome. Por esse motivo, elas têm sido amplamente estudadas em nutrição humana e animal e cuidadosa seleção e manipulação genética das leveduras selvagens por microbiologistas industriais levaram ao aperfeiçoamento das linhagens, com o surgimento das cepas específicas existentes comercialmente. A *Saccharomyces cerevisiae* é estudada há muitos anos como um organismo eucarioto modelo, tendo sido o primeiro a ter o seu genoma completamente sequenciado (Madigan et al., 2004).

Diversos produtos podem ser extraídos a partir do fracionamento da levedura e estes incluem o autolisado, o extrato e a parede celular e o concentrado proteico (Chaud et al., 2007).

Durante o fracionamento, a biomassa da levedura passa por um processo de autólise celular com posterior agitação e pasteurização. Para a obtenção do autolisado integral, realizam-se o pré-aquecimento e a secagem em *spray-dried*. No entanto, o autolisado pasteurizado pode ser submetido a um processo de centrifugação para a separação da fração solúvel (extrato bruto) e insolúvel (parede celular). O extrato bruto é então centrifugado para a purificação e o resíduo de parede celular é separado. Seguem-se a clarificação e a concentração do extrato, que é submetido ao processo de *spray-dried*. Já a parede celular bruta passa por uma lavagem, o sobrenadante é descartado e duas lavagens subsequentes são realizadas. A parede celular é então purificada e seca (*spray-*

*dried*), tornando-se o extrato seco de parede celular de levedura (Sgarbieri et al., 1999). A composição dos principais subprodutos de levedura é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 Composição centesimal aproximada dos subprodutos da levedura

<b>Componente (%)</b>	<b>Células íntegras</b>	<b>Autolisado total</b>	<b>Extrato</b>	<b>Parede celular</b>
Proteína	48,74	46,45	61,54	<b>32,70</b>
RNA	5,70	7,90	6,90	<b>1,83</b>
Lipídeos	3,33	3,30	1,89	<b>4,54</b>
Cinzas	8,55	8,83	12,50	<b>4,43</b>
Fibra total	24,40	25,03	2,70	<b>55,04</b>
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70	<b>31,59</b>
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00	<b>23,45</b>
Não determinado	10,60	10,82	19,20	<b>1,46</b>

Fonte: Sgarbieri et al. (1999).

Dentre todos esses subprodutos, a parede celular merece destaque por sua constituição particular. Ela também pode ser dividida em frações, sendo uma mais interna, formada por quitina e 1,3 beta-glucano (correspondente a cerca de 50%-60% do peso seco desta) e outra mais externa, constituída por manoproteínas glicosiladas (Zlotnik et al., 1984), conforme descrito a seguir.

## **2.2 Constituição da parede celular da levedura**

### **2.2.1 Porção mais interna da parede: 1,3 beta glucano e quitina**

Na porção mais interna da parede, o 1,3 beta glucano está localizado na lateral e pertence a uma família de compostos na forma espiral, que conferem

elasticidade à célula. Na sua forma madura, suas cadeias são moderadamente ramificadas, estando de 3% a 4% unidas a resíduos de glicose por ligações beta 1,6. O beta 1,3 glucano é sintetizado como cadeia linear e a presença de ramificações nas moléculas maduras é resultante da ação de enzimas processadoras, sendo o grau de ramificação dependente das condições de crescimento (Klis et al., 2002).

Já a quitina é linear e está presente dentro e ao redor da cicatriz de germinação e, em menor grau, dispersa nas paredes laterais da célula-mãe. Consiste em cerca de 190 monômeros de N-acetilglucosamina e sua síntese envolve a participação de três enzimas, sendo intensamente regulada. Sob condições normais, sua concentração é baixa, de 1%-2%. No entanto, em células com a parede celular enfraquecida (por questões genéticas), a síntese de quitina é estimulada como um mecanismo de defesa e pode chegar a 20% da matéria seca desta (Klis et al., 2002).

Em meio a essas duas porções principais da fração mais interna da parede celular, está o beta 1,6 glucano. Este, em sua forma madura, constitui um polímero hidrossolúvel altamente ramificado, com cerca de 130 monômeros de glicose que conectam proteínas à rede de beta 1,3 glucanos e servem como receptor para quitina em caso de estresse da parede celular (Klis et al., 2002).

Devido à presença desses carboidratos, a porção mais interna, normalmente, está associada ao controle osmótico, à proteção contra injúrias mecânicas e à determinação da forma celular do microrganismo. Esse papel estrutural dos glucanos pode ser confirmado pelo fato de que células isoladas da parede celular podem ser dissolvidas quase que inteiramente quando se utiliza uma 1,3 beta-glucanase. Além disso, devido à sua porosidade e à presença de enzimas, como a invertase e a fosfatase alcanina, controla a entrada de substâncias que terão contato com a membrana plasmática (Zlotnik et al., 1984).

### **2.2.2 Porção mais externa da parede: as manoproteínas**

A porção mais externa da parede celular é formada por manoproteínas altamente glicosiladas, cuja fração carboidrato, normalmente, corresponde a cerca de 90% da estrutura. Aproximadamente 50% das manoproteínas são compostas pelo mananoligossacarídeo (Shetty & Jespersen, 2006), um carboidrato complexo contendo D-manose (Fernandes et al., 2008).

Coletivamente, as manoproteínas formam a fração manana da levedura, uma camada fibrilar e elétron-densa. São sintetizadas a partir de duas reações: a N-glicosilação e a O-manosilação.

As leveduras parecem ser as espécies mais primitivas a realizarem a N-glicosilação, que consiste na ligação glicosídica entre uma N-acetilglucosamina e um resíduo de asparagina (Lesage & Bussey, 2006). Em vertebrados, as glicoproteínas N-modificadas adquirem o oligossacarídeo inicial no retículo endoplasmático e formam cadeias contendo de 9-13 resíduos de manose. No entanto, a endomanosidase que cliva a glicose-1,3-manose em glicoproteínas não é encontrada nas leveduras. Assim, nelas, as glicoproteínas da parede celular são manosiladas no Golgi. Cada um desses resíduos de manose é adicionado diretamente da GDP-manose, em vez do dolicol-fosfato-manose. Na síntese de manano, a ampliação da cadeia longa principal é realizada pela alfa-manosiltransferase específica. Assim, cada unidade de alfa 1,6 manana é ramificada pela adição de alfa 1,2 e alfa 1,3 manana. Há uma evidência recente de que as transferases alfa 1,6 e 1,2 existem como parte de um complexo no Golgi da levedura.

Outro ponto importante na síntese é a adição de manano-1-fosfato na posição 6 de uma unidade de alfa 1,3 manano. Como nas outras reações de manosilação, é o GDP-manano que realiza a doação. Sabe-se que, na biossíntese do mananofosforilado na levedura, a ligação fosfodiéster desempenha um papel crítico. O resultado final dessas reações é a formação de uma estrutura altamente

ramificada, contendo cerca de 200 resíduos de manose (Varki et al., 1999) (figura 1).

Por sua vez, as proteínas O-manosiladas recebem cadeias curtas de manose na extremidade hidroxil da serina ou em resíduos de treonina a partir de uma ligação manosil. Os mananos também contêm O-glicanos que são iniciados com cadeias manose em vez das típicas de galactose-N-acetilglucosamina encontradas em mamíferos. O dolicol fosfato manano é o doador para o primeiro resíduo que está atachado à serina/treonina no retículo endoplasmático. O alongamento da cadeia pela adição de dois ou três resíduos de manose ocorre no Golgi e usa o GDP-manose como doador, sendo este transportador crítico para a síntese de glicanos N e O na levedura (Varki et al., 1999).

Já as proteínas são classificadas em duas categorias: as GPI (glicosilfosfatidilinositol) e as Pir (proteínas internas de repetição). Elas diferem entre si, pois as Pir parecem estar diretamente ligadas às moléculas de beta 1,3 glucano, sem se conectar com a porção beta 1,6 glucano e podem ser liberadas da parede celular por meio da utilização de um álcali (Smits et al., 1999).

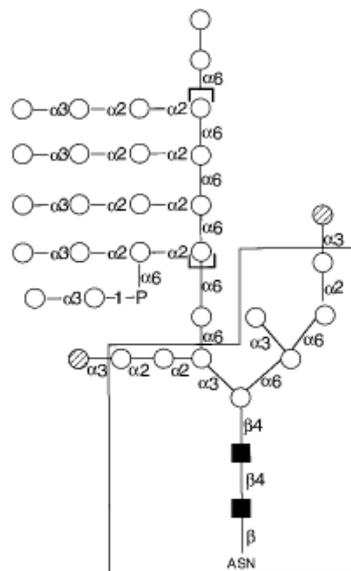


FIGURA 1 N-glicosilação na levedura. Um resíduo de manose é removido no retículo endoplasmático para formar a estrutura (na caixa). Uma pequena porção dessas moléculas é alongada para originar uma camada mais interna, com 9-15 manoses (hachurado). Outros oligossacarídeos são alongados pela construção de uma sequência linear de unidades de alfa-manose (colchetes). Esta camada pode ser modificada mais tarde pela adição de resíduos de manose com ligações alfa 1,2 e alfa 1,3, para completar a estrutura (manana). Além disso, as mananas também são fosforiladas pela adição de resíduos de manose 1-fosfato no C-6 de uma alfa 1,2 manose para formar um fosfodiéster. Todos os resíduos de manose possuem ligação alfa, com exceção da manose ligada ao resíduo de N-acetilglucosamina que possui ligação beta.  $\circ$  = manose (man),  $\blacksquare$  = N-acetilglucosamina (GlcNAc), ASN- asparagina. Adaptado de Varki et al. (1999).

Devido a essas características bioquímicas e estruturais, a face externa da parede celular, formada pelas manoproteínas, é muito menos permeável às macromoléculas do que a interna e sua grande função são os eventos de reconhecimento celular (Klis et al., 2002). A composição da parede celular está apresentada na Tabela 2 e na Figura 2.

TABELA 2 Composição da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Macromolécula	% peso PC*	Local de síntese	Forma madura	
			GP	Ramificação
Manoproteínas	35-40	Secreção	200 <sup>a</sup>	Alta
Beta1,6-glucano	5-10	(MP)	140	Alta
Beta1,3-glucano	50-55	MP	1500	Moderada
Quitina	1-2	MP	190 <sup>b</sup>	Linear

\* % da matéria seca; a, N-cadeias; b, quitina da cicatriz de germinação; PC, parede celular; GP, grau de polimerização; MP, membrana plasmática. Adaptado de Klis et al. (2002).

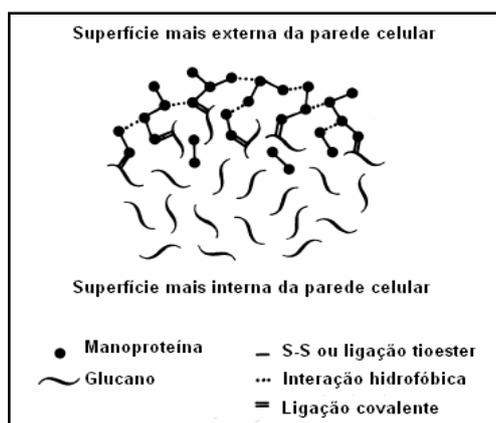


FIGURA 2 Esquematização da estrutura da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Na figura, não há distinção entre os glucanos com ligações beta 1,6 ou beta 1,3. Adaptado de Zlotnik et al. (1984).

Suas características estruturais é que levariam à ocorrência de todos os efeitos benéficos a ele atribuídos. Uma visão geral dos sistemas fisiológicos sobre os quais o MOS age, bem como seus mecanismos de ação específicos, é fornecida a seguir.

### **2.3 Características morfológicas e funcionais do intestino grosso**

Em gatos, o intestino grosso é relativamente curto e mede em torno de 0,4 m. Suas principais funções são a absorção de eletrólitos e água, além da fermentação microbiana de nutrientes que escapam da digestão e da absorção no intestino delgado. Anatomicamente, consiste do ceco, cólon e reto; o cólon compreende a maior parte e é dividido em ascendente, transverso e descendente (National Research Council, 2006).

Histologicamente, as quatro túnicas características do tubo digestivo (mucosa, submucosa, muscular e serosa) estão presentes. Contudo, não se observam pregas circulares nem vilosidades. A mucosa é constituída por epitélio cilíndrico simples (colonócitos) e por células caliciformes (Figura 3), sendo estas últimas as mais numerosas neste do que no epitélio do intestino delgado. Já a túnica submucosa é formada por tecido conjuntivo frouxo que contém vasos e nervos, além do plexo submucoso do sistema nervoso autônomo. A camada muscular apresenta uma camada circular interna, outra mais externa (longitudinal) e o plexo mioentérico. Por fim, a serosa se caracteriza pela presença de tecido conjuntivo frouxo, com muitas células adiposas, vasos sanguíneos e linfáticos (Fieri et al., 1997).

Em relação aos tipos celulares, os colonócitos são as células que respondem pela digestão final e pelo transporte transepitelial dos nutrientes. Possuem prolongamentos de polissacarídeos que penetram no lúmen intestinal, denominados glicocálix. O glicocálix exerce uma série de funções, tais como a manutenção do pH neutro próximo à mucosa intestinal e ligação às bactérias patogênicas e não patogênicas, que são importantes para a ação de enzimas de membrana e para a manutenção da sanidade da mucosa intestinal (Maiorka, 2008).

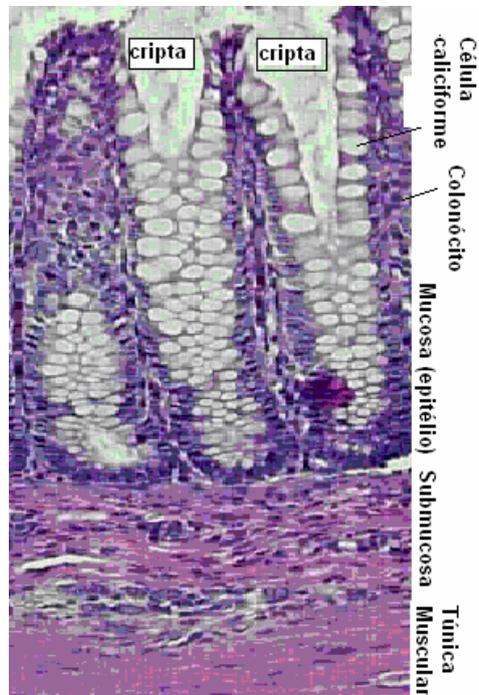


FIGURA 3 Lâmina histológica de cólon canino (hematoxilina/eosina) evidenciando as características teciduais e celulares\*

Já as células caliciformes são as secretoras de mucina (glicoproteínas), que correspondem ao constituinte predominante da camada de muco intestinal e lhe confere a viscosidade. N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucose e galactose são os principais oligossacarídeos constituintes da mucina e suas cadeias terminam com ácido siálico ou grupos sulfato, o que contribui para a natureza polianiónica dela em pH neutro (Deplancke & Gaskins, 2001). De forma geral, o muco age como um meio de proteção, lubrificação e transporte entre o lúmen e as células epiteliais, e as células caliciformes sofrem hiperplasia

---

\* Adaptado de [www.vivo.colostate.edu](http://www.vivo.colostate.edu).

e aumentam as suas descargas quando ocorre agressão ao tecido (Maiorka, 2008).

Além disso, é importante ressaltar a existência de um tipo celular associado às placas de Peyer no íleo (região de transição da porção final do intestino delgado e início do intestino grosso), denominado células M, pois elas são importantes para a indução de resposta imunológica de mucosa. Elas possuem uma borda em escova pobremente organizada, com capacidade endocítica e linfócitos justapostos na superfície basolateral (Lu & Walker, 2001).

Para que haja a formação desse epitélio característico, são necessárias duas fases de diferenciação: a que inclui os processos que ocorrem durante a ontogênese e a que agrega os eventos que se desenvolvem ao longo da vida. A divisão celular que acontece durante a embriogênese imprime as características epiteliais fenotípicas que aparecerão posteriormente e, durante este processo, cada tipo celular sofre mudanças morfológicas distintas. No intestino adulto, a migração de células diferenciadas ao longo do eixo cripta-ápice é perpetuada por um *pool* de células em divisão, presente nas criptas (Louvard et al., 1992). Esta maturação está na dependência da síntese de proteínas estruturais, as quais são codificadas pelo genoma das células e os mecanismos indutores do desenvolvimento estão sob influência de fatores intrínsecos e extrínsecos. A mucosa intestinal tem crescimento contínuo, sendo afetada tanto pelos nutrientes da dieta como pelos níveis de hormônios circulantes (Maiorka, 2008).

Assim, as células que estão no ápice apresentam contato a partir de seu polo basal com a matriz extracelular sintetizada pelas subjacentes. Este exoesqueleto interage com os receptores de superfície celular que traduzem a informação do ambiente para os compartimentos intracelulares. Estas interações desempenham papel importante na maturação, migração e renovação das células epiteliais (Louvard et al., 1992).

Neste contexto, podem ser distinguidas cerca de quatro categorias de moléculas de adesão: as caderinas, as integrinas, as selectinas e as imunoglobulinas.

As caderinas pertencem a uma família de glicoproteínas envolvidas no mecanismo de adesão célula-célula  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes e são detectadas na maioria dos tecidos. A inibição da atividade das caderinas com anticorpos induz a dissociação de camadas celulares, indicando uma importância fundamental delas na manutenção das estruturas multicelulares (Takeichi, 1995).

As integrinas regulam a formação de grupos celulares na junção de adesão bem como a ativação de vários mecanismos de sinalização, levando à modulação da expressão gênica. Há diversas subclasses envolvidas na proliferação e na diferenciação celular (Lussier et al., 2000). Isso ocorre porque a adesão de células à matriz extracelular contém integrinas que recrutam a quinases, induzindo a diferenciação mitogênica. Os diferentes tipos de matriz parecem sinalizar a partir de diferenciadas integrinas e estas traduzem sinais correspondentes, sendo a resposta matriz-dependente. Por exemplo, as células epiteliais intestinais, quando cultivadas em colágeno ou laminina, levam à multiplicação celular. Por outro lado, se as mesmas células são cultivadas em fibronectina, o mesmo estímulo inibe a mitogênese (Iqbal & Zaidi, 2005).

Já as selectinas pertencem a uma pequena família dos receptores tipo lectina, compostas por três membros: L, E e P. Essas moléculas mediam interações heterotípicas por meio de reconhecimento de glicanos cálcio-dependentes (Aplin et al., 1998).

Por sua vez, as imunoglobulinas pertencem a uma ampla superfamília de moléculas de adesão celular. Um exemplo clássico de receptor dessa classe é o NCAM, que contém cinco dobras de imunoglobulinas na sua porção extracelular. Há três formas de NCAM, duas com domínio transmembrana e

uma contendo N-glicosilfosfatidilinositol ligado à membrana (Aplin et al., 1998).

Dessa forma, a regulação da adesão celular durante a migração envolve um mecanismo controlado (que inclui a participação de moléculas de adesão) e com interação de inúmeros fatores (Wilson & Gibson, 1997).

Diversas substâncias podem interferir nesse processo, estimulando-o. Elas são denominadas de agentes tróficos, pois interferem no desenvolvimento da mucosa intestinal, acelerando o processo mitótico na região cripta-vilo e provocando hiperplasia e hipertrofia celular (Maiorka, 2008). Dentre eles, podem-se citar os fatores de crescimento, peptídeos, glutamina, ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico), citocinas, óxido nítrico e neuropeptídeos (Wilson & Gibson, 1997).

O uso de MOS poderia interferir com a modulação da microbiota intestinal e a consequente produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O papel dos AGCC no processo de mitose e renovação epitelial será discutido posteriormente.

#### **2.4 Microbiota intestinal**

A modulação da microbiota intestinal é o ponto chave para a determinação dos efeitos benéficos demonstrados pelo mananoligossacarídeo. Dessa forma, conhecer as principais espécies bacterianas que habitam o trato digestório, especialmente o cólon, bem como os processos de sucessão, adesão, nutrição bacteriana e fatores que interferem no estabelecimento de microrganismos, é essencial para o entendimento do mecanismo de ação desse oligossacarídeo.

### **2.4.1 Características gerais**

A microbiota do trato gastrointestinal é caracterizada por alta densidade populacional, ampla variedade e complexidade de interações entre as diversas espécies de microrganismos que a compõem. A maior parte é formada por bactérias, embora os protozoários também possam estar presentes (Mackie et al., 1999). Sua característica é reflexo das diferenças anatômicas e fisiológicas das porções do trato e cada espécie microbiana coloniza regiões às quais está mais bem adaptada. No entanto, é importante considerar que, além da população residente, algumas espécies bacterianas contaminantes podem estar presentes, dependendo de determinados fatores, tais como o ambiente no qual o animal está inserido e a dieta que recebe (Fernandes et al., 2008).

O estômago e o intestino delgado constituem regiões inóspitas para o desenvolvimento bacteriano, devido à presença dos sucos gástrico, da bile e do suco pancreático, que possuem ação bactericida (Brandt et al., 2006). Por esse motivo, o estômago possui apenas de  $10^1$  a  $10^2$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de secreções residuais e o intestino delgado, de  $10^1$  a  $10^2$  UFC por grama de conteúdo na porção cranial e  $10^3$  a  $10^4$  UFC na caudal (Fernandes et al., 2008). É no intestino grosso que as bactérias encontram condições favoráveis para a sua proliferação, devido à ausência de secreções intestinais que inibam o crescimento microbiano, o peristaltismo lento e o abundante suprimento nutricional (Brandt et al., 2006). Assim, a população bacteriana nessa região é de, aproximadamente,  $10^{10}$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colônia por grama de conteúdo (Fernandes et al., 2008).

O processo de colonização do trato gastrointestinal pelos microrganismos é complexo e envolve uma série de interações entre as populações bacterianas e também entre elas e o hospedeiro. No útero, os fetos são estéreis e, dessa forma, tanto o momento do parto quanto o ambiente em que o animal se encontra são fundamentais para o estabelecimento da microbiota. Microrganismos vaginais

podem ser encontrados na boca e no estômago de recém-nascidos. Após o nascimento, os microrganismos ambientais, orais e cutâneos da mãe são automaticamente transferidos para o neonato por processos que incluem a amamentação. Posteriormente, eles continuam sendo expostos à entrada de novos microrganismos no trato gastrointestinal a partir da alimentação. Assim, poucos dias após o nascimento, coliformes e *Streptococcus* sp. predominam na maioria das espécies. Os anaeróbios obrigatórios aparecem algum tempo depois e *Clostridium* sp. e *Lactobacillus* sp. estão presentes em grande parte dos hospedeiros em um curto período de tempo (Mackie et al., 1999).

O estabelecimento da microbiota é extremamente importante, pois a competição pelos sítios de ligação desempenha um papel fundamental na proteção contra patógenos. Os mecanismos por meio dos quais essa proteção ocorre incluem competição por nutrientes essenciais ou sítios de ligação ao epitélio, produção de compostos antimicrobianos, metabolização de nutrientes até ácidos graxos de cadeia curta e modificação química dos ácidos biliares que criam um ambiente desfavorável ao crescimento de muitos patógenos entéricos. Pela indução do recrutamento das células imunes da lâmina própria, a microbiota também pode ativar os mecanismos inflamatórios e imunes apropriados contra a infecção crônica. Parece também que as bactérias presentes na microbiota podem alterar a expressão das glicoproteínas na superfície da célula intestinal (Lu & Walker, 2001).

#### **2.4.2 Principais gêneros de bactérias presentes na microbiota do intestino grosso**

A enorme população bacteriana é composta, predominantemente, por poucos gêneros altamente diversos quanto às espécies. Cerca de 99% das espécies são anaeróbias e o 1% restante é composto especialmente pela *Escherichia coli*, uma bactéria aeróbia facultativa (Swenson & Reece, 1996).

Em seres humanos predominam *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Em felinos, há poucos estudos avaliando a microbiota, mas foram isolados os seguintes microrganismos: *Corynebacterium*, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Eubacteria* e *Bacteroides*, conforme demonstrado na Figura 4 (Rastall, 2004).

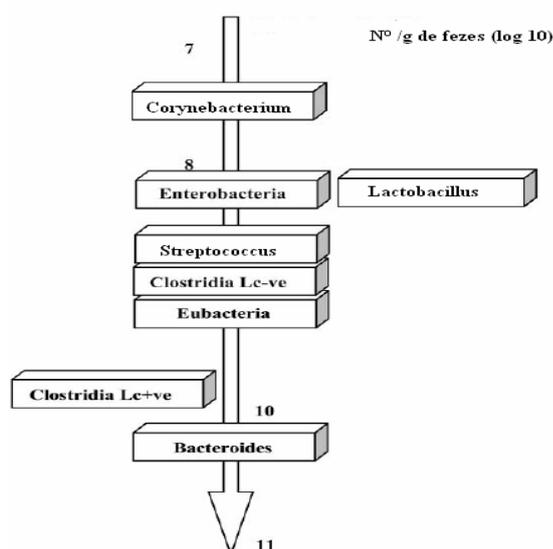


FIGURA 4 Principais microrganismos do cólon de felinos. Adaptado de Rastall (2004).

As bactérias entéricas (*Enterobacteriaceae*) correspondem a um grupo relativamente homogêneo, do ponto de vista filogenético, e são caracterizadas fenotipicamente por serem bacilos não esporulantes gram-negativos, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia, anaeróbios facultativos, oxidase-negativos, com exigências nutricionais relativamente simples, fermentando açúcares e originando uma grande variedade de produtos finais (Holt et al., 1994).

Dentre as enterobactérias presentes na mucosa intestinal, as principais são *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Enterobacter*.

As bactérias do gênero *Escherichia* são consideradas habitantes naturais do trato gastrointestinal de animais de sangue quente. Algumas espécies podem desempenhar papel importante na síntese de vitaminas, particularmente a K. Devido à sua natureza anaeróbia facultativa, esse organismo, provavelmente, também auxilia no consumo de oxigênio, tornando o intestino grosso anóxico. Linhagens selvagens raramente apresentam exigências em relação a qualquer fator de crescimento, sendo capazes de crescer a partir de uma grande variedade de fontes de carbono e energia, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros (Mandigan et al., 2004). As bactérias do gênero *Salmonella* são potencialmente patogênicas e apresentam cerca de 2000 sorovares, podendo contaminar alimentos em condições precárias de higiene. O gênero *Proteus* inclui organismos ativamente móveis e que podem causar infecções relacionadas ao trato urinário. A *Klebsiella* é capaz de fixar o oxigênio, sendo potencial causadora de pneumonia em indivíduos debilitados e a *Enterobacter aerogenes* é uma espécie potencialmente patogênica comumente encontrada em águas, esgotos e sistema gastrointestinal de animais de sangue quente (Tortora et al., 2002).

Por sua vez, as bactérias do gênero *Corynebacterium* são bastonetes gram-positivos, anaeróbias, pleomórficas e sua morfologia varia de acordo com a idade das células (Tortora et al., 2002).

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes gram-positivos, formadores de esporos, anaeróbios obrigatórios e catalase negativos. A principal espécie desse gênero presente no trato intestinal de animais é o *C. perfringens* (Tortora et al., 2002). Os *Lactobacillus* são gram-positivos, não formadores de esporo, raramente patogênicas e que fazem parte do grupo de bactérias lácticas e fermentadoras de ácido láctico. São mais resistentes às condições ácidas do que

as outras bactérias dessa categoria e podem crescer em valores baixos de pH, como quatro. Essa sua resistência faz com que ela possa crescer em condições em que se atingem valores de pH demasiadamente baixos e são responsáveis pela fase final nos processos de fermentação do ácido láctico (Mandigan et al., 2004).

As bactérias do gênero *Eubacterium* são bacilos anaeróbios obrigatórios, presentes no solo e no trato intestinal de animais, mas que podem se tornar patogênicas (Holt et al., 1994).

Os bacteroides contêm espécies anaeróbias obrigatórias, não esporolíticas. Algumas espécies são patogênicas e outras sintetizam esfingolípideos (lipídeos que possuem amino-álcool de cadeia longa, a esfingosina, em substituição ao glicerol) (Holt et al., 1994).

Finalmente, os estreptococos são cocos gram-positivos que estão amplamente distribuídos pela natureza e que incluem uma série de espécies homofermentativas de considerável importância prática (Holt et al., 1994).

A microbiota tende a ser estável quanto às espécies bacterianas e ao número de colônias ao longo do tempo, acompanhando o indivíduo durante toda a vida. Algumas bactérias patogênicas (como *E. coli* e *Clostridium perfringens*) podem viver em harmonia com os seus hospedeiros, tornando-se patogênicas apenas quando o ecossistema é prejudicado de alguma forma. Da mesma maneira, espécies que são comuns no trato gastrointestinal de um determinado animal podem ser eventuais em outro (Mackie et al., 1999).

Em seres humanos, cães e outras espécies, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* merecem destaque como bactérias promotoras da saúde intestinal, constituindo os maiores componentes da barreira microbiana contra a infecção (Mackie et al., 1999). Em felinos, o isolamento de bifidobactérias das fezes é mais difícil do que em caninos e sua concentração parece ser menor do que na maioria das espécies domésticas (Rastall et al., 2004).

### 2.4.3 Adesão

A colonização do trato gastrointestinal e a formação da microbiota característica dependem da capacidade de adesão das bactérias aos sítios na mucosa intestinal (Brandt et al., 2006).

A ligação da bactéria à superfície celular constitui no primeiro desafio aos microrganismos e as espécies com boa capacidade de adesão tendem a colonizar de forma permanente o trato gastrointestinal, sem necessidade de reintrodução periódica, constituindo a denominada flora autóctone. Por outro lado, espécies alóctones (transitórias) são aquelas externas ao ecossistema intestinal, sem adequada capacidade de aderir à mucosa (Brandt et al., 2006).

Um dos principais fatores a se considerar no estudo da adesão de microrganismos é que a superfície de células eucarióticas e procarióticas é negativamente carregada. Assim, para garantir a ligação, é necessário que essa repulsão seja contornada por meio de forças de hidrofobicidade. As fimbrias podem realizar esse papel a partir da redução no potencial de membrana da superfície celular por meio da inibição da contribuição da capacidade repulsiva dos polissacarídeos do antígeno K (da cápsula) e do lipopolissacarídeo-LPS (Gaastra & Graaf, 1982).

Dentre as fimbrias, a do tipo 1 merece destaque. Elas são estruturas semelhantes a pelos, localizadas na superfície da célula bacteriana e que medem a adesão de células manose-sensíveis. São as adesinas bacterianas mais comuns, expressas por uma infinidade de enterobactérias comensais e patogênicas e também por outras famílias de bactérias (Thomas et al., 2002). São organelas heteropolímeras, composta por uma porção maior de natureza proteica (FimA) e três subunidades menores (FimF, FimG e a FimH). A FimH está relacionada à capacidade de adesão e sua inativação resulta em abolição da ligação sem qualquer efeito aparente na expressão das fimbrias (Duncan et al., 2005). A sequência de aminoácidos das fimbrias tipo 1, expressa pelas diferentes cepas de

*Escherichia coli*, mantém, em média, 99% de conservação e todas as bactérias com essa organela são capazes de se ligar fortemente a estruturas contendo tri-manose. Por outro lado, a maioria das *E.coli* intestinais não se liga fortemente a estruturas que contenham resíduos de monomanose (Thomas et al., 2002; Duncan et al., 2005).

Há diferenças inter e intraespécies na expressão das fímbrias e elas podem ser explicadas por diversos motivos. A diversidade na especificidade do açúcar entre *E. coli* e *Klebsiella*, por exemplo, é influenciada pela organização das fímbrias que pode induzir a conformações distintas na subunidade FimH. A heterogenidade intraespécie pode ser atribuída a uma variação alélica na estrutura primária de aminoácidos da FimH, o que é importante para definir a patogenicidade dos microrganismos (Duncan et al., 2005).

A expressão dos genes que codificam o aparecimento e o crescimento dessas organelas pode ser alterada por fatores como temperatura e disponibilidade de nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio, etc.) (Edwards & Puente, 1998). Assim, é preciso considerar a correlação entre a adesão, a presença de pili manose específico e a hidrofobicidade da superfície celular, quando se estuda a adesão de microrganismos (Jann et al., 1981).

Normalmente, o processo de adesão ocorre na presença de estresse e a meia-vida de ligação ao receptor é encurtada em função de forças externas. Fluidos e secreções do trato gastrointestinal funcionam como uma defesa natural e as bactérias necessitam de uma força cerca de 10 vezes maior que aquela de estresse. A habilidade da fímbria para atuar como um sensor de força e originar um mecanismo molecular capaz de identificar a superfície exposta e as moléculas receptoras solúveis é fundamental para possibilitar uma adesão eficiente, impedindo o destacamento da bactéria da superfície da célula alvo. No entanto, é necessário que haja uma modulação da força de ligação de adesinas, dependendo das condições de estresse. No caso de bactérias patogênicas, uma

adesão muito forte pode ser desvantajosa, pois impediria a entrada na célula, mesmo sob baixas forças de estresse. Além disso, as adesinas poderiam se ligar a receptores inibidores com a mesma alta afinidade que os receptores de superfície. Tem sido sugerido que as interações bactéria-superfície podem ser melhoradas pela força. No entanto, não tem sido demonstrado diretamente se e como as propriedades das adesinas bacterianas podem ser moduladas por essas forças (Thomas et al., 2002).

Alguns trabalhos têm demonstrado o efeito de bactérias probióticas sobre a adesão de outras espécies na mucosa intestinal. Tuomola et al. (1999), ao estudarem o efeito de *Lactobacillus* sobre adesão de *E. coli* e de *Salmonella* em glicoproteínas extraídas das fezes de seres humanos, concluíra que as cepas de *Lactobacillus rhamnosus* foram capazes de reduzir a adesão de *E. coli* mediada por fimbrias.

Além da competição pela adesão e dos mecanismos imunológicos, um fator proteínico secretado por *Lactobacillus* spp. e/ou *Bifidobacterium* spp. parece estar envolvido na proteção contra as bactérias patogênicas. Madsen et al. (2001) relataram que o tratamento de ratos deficientes em IL-10 com bactérias probióticas normalizou a histologia e a função do cólon, além da integridade da barreira mucosa, com diminuição da secreção de fator de necrose tumoral alfa e de interferon gama. Além disso, foi observada diminuição da adesão de *Salmonella* com melhora da integridade da barreira epitelial nos animais expostos ao fator proteínico secretados pelas bactérias probióticas.

Outro fator a ser considerado é que a adesão bacteriana às células intestinais permite um número máximo de sítios de adesão para cada célula bacteriana. Ao comparar duas espécies de *Lactobacillus* e a *E. coli*, Lee et al. (2000) constataram que o *L.rhamnosus* tem capacidade de adesão dez vezes mais alta que do *L. casei shirota* e três vezes maior que da *E. coli*. Dessa forma, os cálculos sugerem que se *L.casei shirota* e *E.coli* competem pelo mesmo sítio

no intestino, essa espécie não poderia prevenir a adesão de *E.coli*. No entanto, o *L.casei* tem mais alta afinidade (menor constante de dissociação) que as outras duas bactérias, o que significa que se liga mais prontamente e se dissocia mais dificilmente das células enterais. Por esse estudo, conclui-se que, para alcançar bons resultados na adesão de *Lactobacillus*, é necessário que a relação concentração de células de *E. coli* e de *Lactobacillus* (EC/EL) seja mais baixa. Para obter esses resultados, o *L. rhamnosus* deve alcançar a saturação, ou seja, estar em número cerca de 100 vezes maior que a sua constante de dissociação ou mais alto que  $2,08 \times 10^{10}$  cel/mL. Tem sido descrito que a presença diária de células viáveis na ordem de  $10^6$ - $10^{10}$  é necessária para o desenvolvimento de efeitos benéficos promovidos pelas bactérias probióticas.

Alguns estudos com *Lactobacillus plantarum* demonstraram que a sua habilidade em inibir a aderência de outros organismos às células epiteliais é mediada pelo aumento da expressão de MUC2 e MUC3 e, conseqüentemente, da produção de mucina (Tellez et al., 2006).

Em estudo realizado por Ouwehand et al. (1999), com diversas espécies de bactérias probióticas, verificou-se que a sua adesão varia de 3% (*L. casei*) a 43% (*L. rhamnosus* GC) e que está intimamente ligada ao muco imobilizador. As diferenças na adesão podem ajudar a explicar por que certas cepas são excretadas por períodos mais longos que outras após a cessão da administração de probióticos, obtendo-se diferentes efeitos sobre a saúde.

Em cães, foi testada a capacidade de adesão ao muco do intestino delgado de quatro cepas de bactérias autóctones do trato gastrintestinal de seres humanos, sendo duas de animais e duas isoladas da microbiota dos próprios cães. A cepa de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), humana, aderiu significativamente melhor que as outras. O pré-tratamento com suco jejunal canino para simular a digestão diminuiu drasticamente a adesão de cepas

específicas, no entanto, as de seres humanos aderiram melhor que a de animais, mostrando sua viabilidade para uso em cães (Rinkinen et al., 2000).

#### **2.4.4 Nutrição bacteriana e produtos finais de fermentação**

A nutrição microbiana no fornecimento de nutrientes necessários à síntese dos monômeros pelas células. Organismos distintos necessitam de diferentes conjuntos de nutrientes, sendo necessários sob uma ou outra forma específica e em concentrações diferentes. Carbono e nitrogênio são os principais macronutrientes necessários às bactérias. Em termos de peso seco, uma célula típica contém cerca de 50% de carbono e 15% de nitrogênio. Outros macronutrientes importantes incluem P, S, K, Mg, Ca, Na e Fe. Os micronutrientes funcionam como componentes de enzimas e, normalmente, são exigidos em concentrações muito pequenas e os fatores de crescimento, definidos como compostos orgânicos necessários em baixas concentrações e que incluem vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas são sintetizados pela maioria dos microrganismos. As vitaminas correspondem aos fatores de crescimento mais exigidos e atuam, normalmente, como coenzimas (Mandigan et al., 2004).

Os microrganismos podem utilizar carboidratos, proteínas e/ou lipídeos para atender às suas necessidades e muitos produtos finais são gerados como resultado da utilização desses nutrientes. Após a glicose ter sido quebrada a piruvato, este pode ser completamente utilizado na respiração, entrando no ciclo de Krebs e gerando 38 ATPs ou pode ser convertido a um produto orgânico na fermentação. A fermentação libera energia de açúcares ou moléculas orgânicas, como aminoácidos, ácidos orgânicos, purina e pirimidinas. Ela ocorre em condições de anaerobiose, utiliza uma molécula orgânica como acceptor final de elétrons e produz apenas pequenas quantidades de ATP (somente uma ou duas moléculas para cada material inicial). Diversos microrganismos podem

fermentar vários carboidratos e o produto final depende do microrganismo em particular, do substrato e das enzimas que estão presentes e ativas (Tortora et al., 2002).

Dentre a grande variedade de metabólitos provenientes da fermentação pelas bactérias, merecem destaque os ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) que são, normalmente, produzidos na relação aproximada de 3:1:1 (Commane et al., 2005).

Diversos mecanismos para a formação desses ácidos são conhecidos. A acetogênese, que é a excreção de acetato no meio, resulta da necessidade de regeneração do  $\text{NAD}^+$  consumido pela glicólise e de reciclagem da coenzima A (COASH) é necessária para converter o piruvato a acetil-CoA. Já que o ciclo do ácido tricarboxílico completo gera a oxidação de dióxido de carbono, a acetogênese ocorre toda vez que esse ciclo não opera completamente ou quando o fluxo de carbono supera a sua capacidade e de outras vias metabólicas centrais. Assim, ela ocorre frequentemente na fermentação anaeróbica, mas também pode ocorrer aerobicamente quando o aumento na glicose (ou outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis) inibe a respiração celular em um comportamento denominado Cabtree bacteriano. Como consequência desse efeito, 15% da glicose pode ser excretada como acetato. Embora seja considerada como um resultado do superfluxo metabólico, uma recente teoria diz que a excreção de acetato pode permitir um crescimento mais rápido das células de alta densidade por fornecer COASH à enzima 2-cetoglutarato desidrogenase do ciclo do ácido tricarboxílico (Wolfe, 2005).

Quanto ao propionato, há rotas principais para a sua formação: a rota do succinato e a do acrilato a partir do lactato. Um terceiro mecanismo obtém o propionato a partir da fucose como substrato. Parece haver diferenças interindividuais nos mecanismos para a produção desses ácidos, devido à mudança na composição da microbiota intestinal (Louis et al., 2007).

O mecanismo de fermentação para a formação do butirato é análoga às reações de beta oxidação em sequência reversa e há dois mecanismos alternativos para a sua produção a partir do butiril-CoA. O primeiro deles utiliza a fosfotransbutirilase e a butirato quinase. O segundo emprega uma CoAa-transferase, que transfere uma molécula de CoA do butiril para o acetato. Em seres humanos, essa rota é preferencialmente utilizada pela maioria das bactérias produtoras de butirato. Ela pode, até mesmo, auxiliar na destoxificação do excesso de acetato na célula bacteriana sob condições levemente ácidas no cólon proximal. A outra rota que não depende de altas concentrações de acetato pode permitir capacidade de adaptação a diversas condições ambientais (Topping & Clifton, 2001; Louis et al., 2007).

As principais vias para a formação de propionato e butirato estão demonstradas na Figura 5. O acetato é tido como o maior precursor para a síntese de butirato. A pectina, por exemplo, é um substrato com baixa capacidade para a formação de butirato, embora *in vitro* favoreça a produção de grandes concentrações de acetato. No entanto, apenas 50% das bactérias butirogênicas isoladas da microbiota de humanos utilizam o acetato como fonte para a produção de ácido butírico. Assim, a produção de ácido butírico característica da utilização de fontes de fibra e de substâncias prebióticas depende da atividade indireta de um grupo específico de bactérias que o sintetizam. A hipótese que surge é a de que o lactato pode funcionar como precursor desse ácido graxo, a partir da utilização deste por bactérias da microbiota intestinal (Figura 6), entretanto, parece haver acentuada diferença individual na utilização desse substrato (Bourriaud et al., 2005).

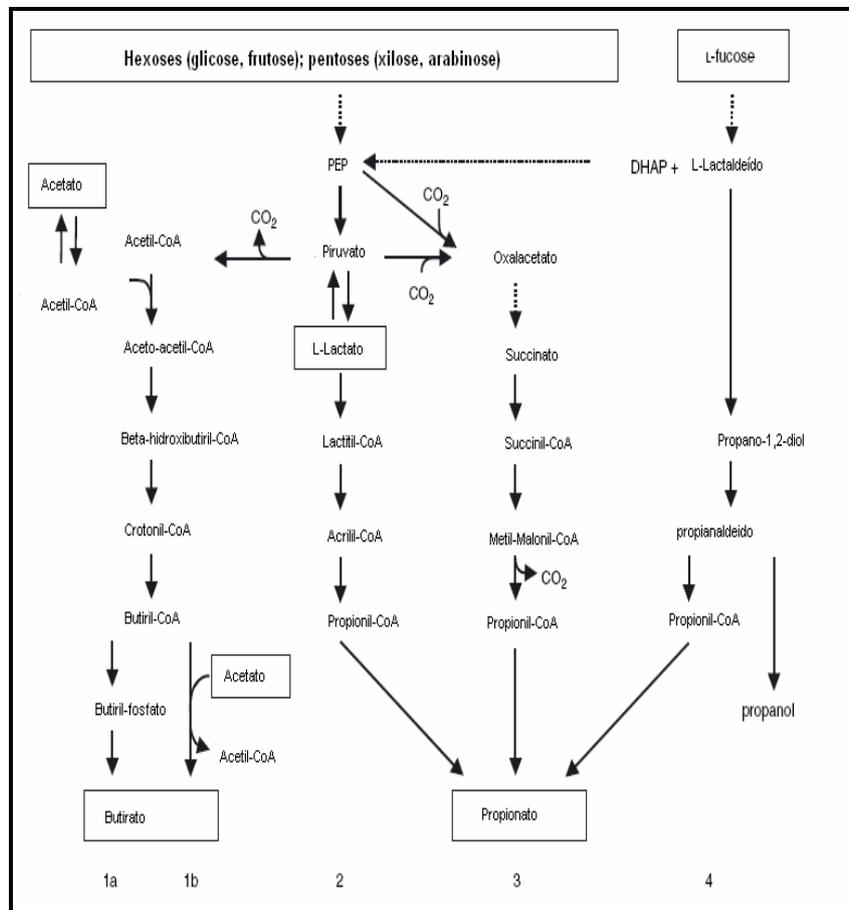


FIGURA 5 Fermentação alternativa para a formação de butirato (1) e propionato (2-4). 1 a. via butiril CoA transferase, 1b . via butirato quinase; 2. via acrilato; 3. via succinato; 4. via propanodiol. As linhas hachuradas indicam intermediários. DHAP, diidroxiacetona fosfato; P, fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato. Adaptado de Louis et al. (2007).

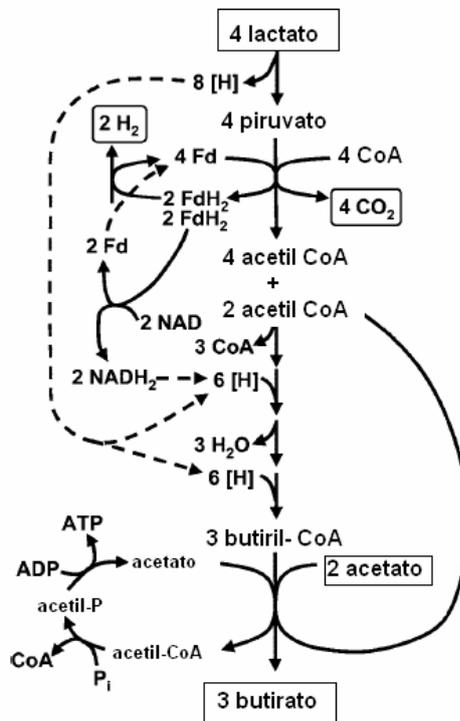


FIGURA 6 Formação de butirato a partir do lactato. Adaptado de Duncan et al. (2004).

Cerca de 95% a 99% dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela fermentação bacteriana são rapidamente absorvidos do lúmen no cólon. Embora o mecanismo exato de absorção não esteja bem definido, alguns pontos devem ser considerados, como: a) o transporte através da membrana apical é dependente da concentração e não mostra cinética de saturação; (b) a difusão não iônica no mecanismo transcelular parece ser o mais importante; (c) a absorção dos AGCC é dependente da absorção de Na<sup>+</sup>, provavelmente por troca de íons Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> e (d) há consideráveis diferenças das regiões do intestino quanto à permeabilidade epitelial dos AGCC (fraca, no epitélio do cólon proximal, forte e dependente de aldosterona no epitélio distal). Pela estimulação

da absorção de sódio e água, eles funcionam como antidiarreico. No entanto, esse efeito pode ser inverso, se ocorre má fermentação (Scheppach, 1994).

A alimentação e o metabolismo cruzado entre bactérias desempenham importante papel na utilização de substratos em um ecossistema densamente constituído (Louis et al., 2007). Entre as enterobactérias, dois padrões de fermentação podem ser identificados e utilizados para separá-las: a ácida mista e a de 2,3-butanediol. Na fermentação ácida mista, três ácidos são formados em quantidades significativas, acético, lático e succínico, sendo também produzidos etano, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Na fermentação de butanediol, quantidades menores de ácidos são formadas, sendo butanediol, etanol, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> os principais produtos. Concentrações iguais de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> são produzidas na fermentação ácida mista, enquanto, na de butanediol, a produção de CO<sub>2</sub> é consideravelmente maior que a de H<sub>2</sub>. Isso porque os microrganismos que realizam a fermentação ácida produzem CO<sub>2</sub> somente a partir de ácido fórmico e essa reação promove a formação de quantidades iguais desses gases. Os fermentadores de butanediol também produzem CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> a partir de ácido fórmico, gerando duas moléculas adicionais de CO<sub>2</sub> durante a formação de cada molécula de butanediol (Mandigan et al., 2004).

Os clostrídeos podem ser divididos em três grupos: os sacarolíticos (como o *C. butyricum*), que são aqueles que produzem ácido butírico a partir da fermentação de açúcares e ácido lático; os proteolíticos (*C. sporogenes*), que fermentam aminoácidos com produção de ácidos graxos de cadeia curta (butírico, acético, propiônico), amônia e aminas (histamina, putrescina, cadaverina) e CO<sub>2</sub> e os sacaro-proteolíticos (*C. perfringens*), que são aqueles que fermentam ambos, açúcares e aminoácidos (Jobim et al., 2001).

As bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus* e *Streptococcus*) oriundas do trato gastrointestinal são, em geral, homofermentativas, ou seja, o único produto

proveniente da fermentação realizada por elas é o ácido láctico (Mandigan et al., 2004).

Já os produtos finais de fermentação das bifidobactérias são, especialmente, o ácido propiônico, o acético, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (Tortora et al., 2002). Elas podem produzi-los a partir do piruvato ou do lactato. Embora não sintetizem o ácido butírico diretamente, sua ação sinérgica com bactérias butíricas que não conseguem fermentar fontes de fibra ou utilizar o lactato parece essencial, pois o ácido acético oriundo da fermentação realizada pelas bifidobactérias pode, então, ser utilizado por essas espécies para a produção do butirato (Belenguer et al., 2006).

Além do *Clostridium*, outros gêneros bacterianos presentes na microbiota do trato gastrintestinal podem ser denominados de butíricos. Dentre elas podem ser citados os gêneros *Eubacterium* e *Fusobacterium* (Bourriaud et al., 2005). No rúmen e no intestino grosso de suínos e roedores, a bactéria *Megasphaera elsdenii* é a principal responsável pela utilização do lactato. Esta espécie pode produzir propionato, butirato, acetato e valerato, dependendo da cepa e do pH do meio, sendo o propionato o maior produto formado por meio da rota do acrilato. Em seres humanos, essa bactéria foi isolada em alguns experimentos, mas, em outros, ela não foi encontrada ou esteve presente em uma minoria de indivíduos. No entanto, há poucas evidências para apontar qual dos três ácidos graxos de cadeia curta é o principal produto da utilização do ácido láctico em seres humanos (Duncan et al., 2004).

Em gatos, o conhecimento a respeito da microbiota intestinal é menor e mais estudos são necessários. De qualquer forma, eubactérias já puderam ser isoladas das fezes desses animais e poderiam estar envolvidas na produção de ácido butírico.

Pelo exposto, fica claro que a interação e o equilíbrio entre a microbiota são importantes para a manutenção da homeostasia do organismo animal. O

lactato (na forma D e/ou L) é o maior produto da fermentação pelas bactérias ácido-láticas, mas seu acúmulo no intestino pode levar à ocorrência de colite ulcerativa e, em casos mais sérios, neurotoxicidade e arritmias cardíacas. Por esse motivo, sua conversão a outros produtos deve ocorrer e o balanço adequado da microbiota é essencial para o alcance desses objetivos (Duncan et al., 2004). Em seres humanos, um exemplo claro desse metabolismo cruzado resultante da quebra de carboidratos foi observado entre as espécies *Bifidobacterium adolescentis* e *Roseburia hominis*. Esta última é um produtor de butirato, mas não pode utilizar o lactato. Assim, o *Bifidobacterium* é direcionado para a degradação primária dos carboidratos com a produção de enzimas extracelulares hidrolíticas, suprindo nutrientes para as bactérias que utilizam substratos parcialmente hidrolisados (Louis et al., 2007).

Os produtos de fermentação e os principais gêneros bacterianos envolvidos na produção de cada um deles estão demonstrados na Figura 7.

Assim, há diversas espécies bacterianas no intestino delgado, mas a função que elas exercem é distinta. Espécies proteolíticas produzem compostos tóxicos, ao passo que os ácidos graxos de cadeia curta, oriundos do metabolismo de outras espécies, são interessantes por aumentar a produção de energia para o intestino (Walker & Duffy, 1998).

Dessa forma, modular a microbiota do trato gastrointestinal é uma medida benéfica que pode ter efeitos positivos sobre a saúde intestinal, com possíveis reflexos sobre a saúde geral dos animais de companhia.

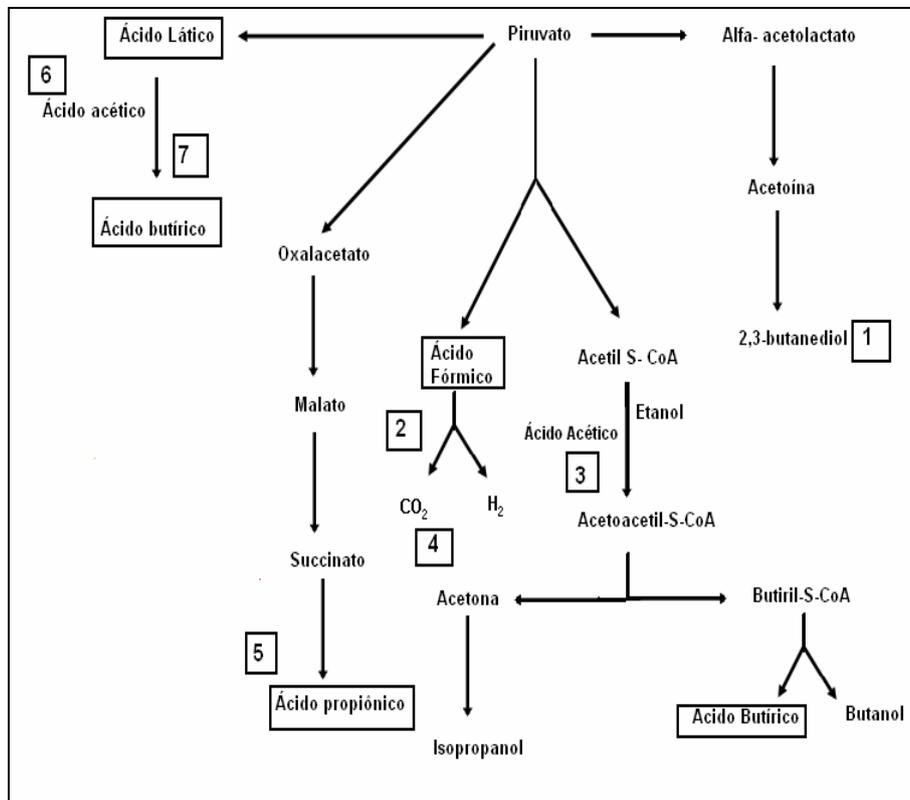


FIGURA 7 Principais produtos oriundos da fermentação bacteriana no intestino grosso. 1. bactérias entéricas fermentadoras de butanediol (*Klebsiella*, *Enterobacter*); 2. *Shigella*; 3. *Clostridium*; 4. bactérias entéricas fermentadoras ácido mistas (*E.coli*, *Salmonella*); 5. bactérias propiônicas (*Bifidobacterium*); 6. bactérias que utilizam o ácido láctico, convertendo-o em acético (*Bifidobacterium*); 7. bactérias butíricas (*Eubacterium*). Baseado em Tortora et al. (2002) e Mandigan et al. (2004).

#### 2.4.5 Fatores que interferem no estabelecimento da microbiota

A regulação fisiológica da microbiota intestinal é necessária para manter cada espécie bacteriana em seus locais de colonização e em níveis normais, prevenindo possíveis efeitos adversos como o crescimento anormal da população residente, a colonização por microrganismos em sítios atípicos da

mucosa e a fixação de transientes ou patogênicos (Fernandes et al., 2008). Esse controle é influenciado por numerosos fatores externos e internos relacionados ao hospedeiro. Dentre os externos, podem-se citar carga bacteriana do ambiente, alimento e hábitos alimentares e composição da microbiota materna (no caso de filhotes). Já entre os internos estão incluídos o pH intestinal e a taxa de esvaziamento gástrico, interações microbianas, temperatura corpórea, fatores fisiológicos, peristaltismo, ácidos biliares, secreções, respostas imunes e receptores de mucosa às bactérias (Mackie et al., 1999). A seguir, serão abordados os principais fatores que interferem na regulação da microbiota intestinal:

a) Secreção de ácido clorídrico: quando a sua secreção é inibida ou reduzida, há aumento do crescimento bacteriano (*E. coli* e *Clostridium*) na porção cranial do intestino delgado (Fernandes et al., 2008).

b) Peristaltismo intestinal: quando ocorre a perda da função peristáltica, o número de bactérias gastrintestinais pode aumentar e microrganismos fecais podem aparecer na parte cranial do intestino delgado. Nessas circunstâncias, *Bacteroides*, bifidobactérias e coliformes passam a ser predominantes (Fernandes et al., 2008).

c) Barreira epitelial, muco e imunoglobulinas: Em geral, mucopolissacarídeos e imunoglobulinas da barreira mucosa previnem a colonização, evitando a aderência e a invasão bacteriana (Fernandes et al., 2008).

Neste contexto, as células membranosas epiteliais (células M) são uma importante via utilizada por essas bactérias gram-negativas para a invasão. Elas levam vantagem sobre a função transcelular das células M e as utilizam para atravessar a membrana epitelial do intestino. Assim, a falta de muco e glicocálix podem facilitar o contato com as moléculas e partículas apicais das células M e estas interações podem levar a mudanças no citoesqueleto da célula, o que

resulta na entrada das bactérias. A entrada de microrganismos nas células epiteliais resulta na produção e na liberação de citocinas pro-inflamatórias. Dessa forma, a resposta à invasão bacteriana ativa sinais intracelulares que levam à iniciação e à amplificação de uma resposta inflamatória aguda. Para manter a integridade da função dessa vulnerável barreira celular, as superfícies mucosas são equipadas com uma resposta inata e adaptativa, as quais têm um componente imune, isto é, tecido linfóide associado à mucosa.

Além da necessidade de interação linfoepitelial, o desenvolvimento das placas de Peyer e das células M parece requerer uma interação com a microbiota intestinal. Ratos livres de microrganismos têm um número reduzido de placas de Peyer, mesmo se forem completamente imunocompetentes, mas os folículos linfóides e as células M aumentam em número quando esses animais são expostos a ambientes contaminados. O repovoamento de bactérias é suficiente para fazer com que o animal restitua o seu número de placas de Peyer com folículos associados ao epitélio das células M. A aderência e a absorção de microrganismos pelas células M parecem permitir uma eficiente amostragem de antígenos pelos sítios de indução do sistema imunológico, resultando em secreção da imunoglobulina polimérica protetora IgA limitando a intensidade e a duração da doença. Mas, conforme dito anteriormente, alguns microrganismos exploram esse processo de transporte para ter acesso à mucosa intestinal e desenvolvem diversas estratégias para escapar das defesas do hospedeiro.

Quando o patógeno entra em contato com o animal, um combate entre ele e o sistema de defesa inato do hospedeiro se desenvolve. A resolução desse encontro é fundamental para definir se ocorrerá infecção e doença. As defesas do hospedeiro são apenas a primeira linha e estão em comunicação com o sistema imune inato. Então, os microrganismos que sobrevivem à interação inicial com as defesas do hospedeiro, usualmente, ativam outras respostas imunes protetoras que têm objetivo conter a infecção. Por causa dessa defesa

seletiva, as bactérias patogênicas devem desenvolver estratégias para evitar ou driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Vários patógenos podem diretamente alterar os componentes das respostas imunofisiológicas do hospedeiro e modular esta atividade para obter vantagem. Dessa forma, a infecção das monocamadas das linhagens de células epiteliais com *Shigella* resulta na expressão coordenada e produção de um conjunto de citocinas pro-inflamatórias, tais como interleucina 8, proteína quimioatraente de monócitos, fator estimulante dos colonócitos granulócito-macrófago e fator de necrose tumoral. Presumivelmente, esta resposta é gerada para proteger o hospedeiro, pela evocação da resposta inflamatória, mas também pode ser utilizada pelos patógenos para destruir barreira epitelial e ter acesso ao ambiente intestinal (Lu & Walker, 2001).

É importante considerar que as imunoglobulinas do tipo IgA são produzidas nas células do plasma e secretadas na superfície das células das mucosas e que são direcionadas a organismos específicos, potencialmente patogênicos. Portanto, elas não regulam o número de bactérias normalmente existente no lúmen intestinal, mas visam diretamente os agentes patogênicos.

d) Intrarregulação da microbiota bacteriana: a população bacteriana normal é muito estável, dificultando, assim, a colonização do intestino por outras bactérias. Esta estabilidade é comprovada pela possibilidade de um segmento intestinal possuir certas espécies e outro segmento possuir espécies diferentes. (Fernandes et al., 2008).

e) Dieta: a influência exercida pela alimentação tem sido mais estudada em seres humanos, embora se saiba que ela também atua na microbiota intestinal dos animais. Poucos estudos discutiram o efeito da dieta na microbiota normal em diferentes sítios no TGI. Alguns desses estudos descrevem efeitos da alimentação sobre a mudança no local da colonização de algumas espécies bacterianas, bem como a sua quantidade no TGI. A deficiência de proteína, por

exemplo, está associada com a diarreia tropical, que se caracteriza pelo aumento do número total de bactérias no intestino delgado e por um índice além do normal de coliformes. Desse modo, torna-se claro que a dieta pode causar mudanças na população de microrganismos e levar o animal a processos patológicos e, nesse sentido, muitos pontos ainda precisam ser esclarecidos. A mudança na dieta é capaz de influenciar a microbiota no intestino delgado com maior intensidade do que no intestino grosso. Em alguns casos, ocorre o crescimento de leveduras e de microrganismos anaeróbios. Pode também provocar mudanças na ação da atividade das enzimas fecais, por exemplo, afetando a produção e ação da b-gluconidase, b-glucosidase, b-galactosidase, nitrorredutase, azorredutase, 7 a-dehidroxilase e colesterol desidrogenase (Fernandes et al., 2008).

Zentek et al. (2004), ao avaliarem o efeito de diferentes fontes proteicas e de processamentos distintos (dietas úmidas e secas à base de frango e carne e alimentos comerciais padrão secos) para duas raças de cães (Pastor Alemão e Beagle) nas concentrações de *C. perfringens*, encontraram diferenças em relação às fontes e ao processamento. O maior número, em log/g de fezes, foi determinado em animais que receberam dietas úmidas e na ração seca à base de frango.

Em felinos, a mensuração do hidrogênio presente no ar expirado (indicativo da atividade de microrganismos) em animais recebendo dietas úmidas e extrusadas mostrou que pode haver diferenças na atividade da microbiota bacteriana entre esses animais. A maior produção de hidrogênio no grupo alimentado com rações úmidas poderia ser devido a uma baixa fermentação de carboidratos que disponibilizaria muito substrato para a fermentação ou à alta concentração de proteína dessas dietas (Backus et al., 2002).

Lubbs et al. (2008), ao compararem dietas contendo moderadas e altas concentrações de proteína (34,34% versus 52,88% de proteína bruta na matéria seca) para cães, verificaram que, nos teores mais altos, as populações de *E.coli* e *Clostridium perfringens* foram maiores, com diminuição no número de *Bifidobacterium* ssp. Os autores sugeriram que, para auxiliar na modulação da microbiota em dietas muito ricas em proteína, pode-se fazer uso de prebióticos.

f) Interações microbianas e hormônios do hospedeiro: há alguns anos, acreditava-se que o fornecimento dos nutrientes necessários possibilitava o crescimento de seres procariotos, independentemente da presença de seres da mesma categoria no meio. No entanto, há, aproximadamente, 15 anos, os resultados de alguns estudos realizados com bactérias começaram a sugerir que haveria a necessidade de comunicação entre os seres da mesma espécie, por meio de moléculas sinalizadoras e que uma grande variedade de hormônios dos animais poderia também interferir no processo de crescimento. Assim, a comunicação celular quimicamente mediada é importante para a ocorrência de alguns eventos, como esporulação e conjugação e uma série de metabólitos secundários (feromônios) é responsável pela manutenção desse comportamento social das bactérias em situações específicas na diferenciação celular. Por outro lado, as catecolaminas secretadas pelo animal podem estimular o crescimento de bactérias gram-negativas, a interleucina-1 e o fator estimulante de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) levam a um aumento no número de *E.coli* e a serotonina pode induzir à elevação no número de *Streptococcus* (*Enterococcus faecalis*) (Kaprelyants & Kell, 1996).

g) Antibioticoterapia: em um estudo utilizando 47 gatos de proprietários, 47 indigentes e 18 hospitalizados, verificou-se a resistência adquirida de microrganismos da microbiota. *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e *Streptococcus canis* foram isolados do reto dos gatos por swab e submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos, demonstrando que, em

animais hospitalizados, os microrganismos podem ser resistentes. Na maioria dos animais, as bactérias foram resistentes a ampicilina, tetraciclina e sulfonamida. *Enterococcus* e *Streptococcus* mostraram resistência à tetraciclina e, em menor extensão, à eritromicina e à tilosina. A maioria do *E. faecium* foi resistente à lincomicina e à penicilina e grande parte dos *E. faecalis* e dos *E. faecium* mostraram resistência à gentamicina (Moyaert et al., 2006).

## **2.5 Cultivo laboratorial de microrganismos**

Diversos fatores precisam ser considerados para a realização do cultivo adequado de microrganismos em laboratório. Isso porque a falta de condições ideais influencia de forma decisiva no crescimento bacteriano, o que interferiria na obtenção de resultados que refletiriam, de maneira mais fiel possível, o número de microrganismos presentes no organismo animal.

Os microrganismos podem ser cultivados em laboratório a partir da utilização de meios de cultura que correspondem a soluções nutrientes utilizadas para promover o seu crescimento (Mandigan et al., 2004). A composição do meio depende dos microrganismos com os quais se pretende trabalhar e os dados quantitativos prévios de crescimento devem ser considerados. À medida que a cultura cresce, as condições do meio se alteram e a velocidade de crescimento também (Monod, 1949). Dentre os principais fatores que interferem no crescimento microbiano estão a temperatura, o pH, a pressão osmótica, os nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e de micronutrientes), os fatores de crescimento (como as vitaminas) e a presença ou a ausência de oxigênio (Tortora et al., 2002).

Quanto à temperatura, cada espécie bacteriana apresenta, para o seu crescimento, uma temperatura mínima, uma máxima e uma ótima (Tortora et al., 2002). As temperaturas ótimas para crescimento do *Clostridium perfringens* estão situadas entre 37°-47°C (Gomes, 2007); para *Escherichia coli*, de 35°-

40°C (Carneiro, 2008) e, para *Lactobacillus* sp., entre 28°-40°C (Xafranski & Reiter, 2008).

Já para o pH, pode-se afirmar que a maioria das bactérias cresce dentro de uma faixa que permite pequenas variações, sempre próximo à neutralidade (entre 6,5-7,5). Algumas poucas são capazes de sobreviver em pH ácido. Durante o cultivo bacteriano em laboratório, as bactérias podem produzir determinados ácidos que, eventualmente, podem interferir em seu próprio crescimento e é comum que os meios de cultura possuam tampões, como sais de fosfato. Em alguns meios, a própria peptona e os aminoácidos desempenham esse papel (Tortora et al., 2002). *Clostridium perfringens* pode crescer na faixa de pH entre 5 e 8 (Gomes, 2007); *Escherichia coli*, de 6,5 a 7 (Neidhardt et al., 1974) e o *Lactobacillus* sp., entre 5,5 e 6,2 como valores ótimos, mas podendo ocorrer crescimento em pH inferior a 5,0 (Xafranski & Reiter, 2008).

Em relação à nutrição, a *E.coli* é pouco exigente. Ela é capaz de crescer em um meio simples, utilizando apenas uma fonte de carbono, como a glicose, para a síntese de todos os compostos necessários ao seu crescimento. Já as bactérias lácticas, especialmente os *Lactobacillus* são fastidiosos (nutricionalmente exigentes) por possuírem menor capacidade biossintética. As exigências em vitaminas dos lactobacilos são altas, chegando a superar a de seres humanos (Mandigan et al., 2004).

A presença e a ausência de oxigênio são fatores importantes a serem considerados. Bactérias do gênero *Clostridium*, por exemplo, são anaeróbias obrigatórias e seu crescimento será extremamente prejudicado em meios que possuam oxigênio (Tortora et al., 2002).

Quanto aos meios de cultura, dentre os mais utilizados laboratorialmente para o cultivo de enterobactérias, o mais comum é o ágar eosina azul de metileno (EMB). O EMB foi inicialmente desenvolvido por Holt-Harris e Teague, em 1916 e era composto por 1% de peptona de Witte, 0,5% de extrato

de carne de Liebig, cloreto de sódio, sucrose, lactose e 1,5% de ágar. Eram adicionados 2mL de eosina amarela a 2% e 2mL de azul de metileno a 0,5% para cada 100mL de meio de cultura. Levine, em 1918, sugeriu uma simplificação do meio em que peptona Difco era empregada como base e 0,2% de fosfato dipotássico utilizado como tampão. Após esterilização, acrescentaram-se ao meio basal 5mL de solução estéril de lactose 20%, 2 mL de eosina amarela 2% e 2 mL de azul de metileno 0,5% para cada 100 mL de meio de cultura (Levine, 1943). Atualmente, meios comerciais BEM, segundo Teague e segundo Levine, estão disponíveis para uso.

O BEM, além de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas pela presença dos corantes de anilina, é diferencial para a *E. coli*. Neste meio de cultura, essas bactérias, por serem intensas fermentadoras de lactose, apresentam o centro negro com um halo esverdeado metálico. A formação dessa coloração típica pode ser explicada por dois fatores: a reação da eosina com o azul de metileno forma um composto de natureza ácida ou neutra e a produção de lactose pelas bactérias (que realizam a fermentação ácida mista) baixa o pH o suficiente para que este composto seja absorvido pelas células da colônia. As bactérias que não fermentam a lactose são incolores neste meio porque este composto não é absorvido em reações alcalinas (Wynne et al., 1942). No entanto, as diferentes cepas e condições de crescimento podem levar ao desenvolvimento de colônias que não apresentam o verde brilhante característico. De qualquer forma, o EMB é uma alternativa para a detecção presuntiva de *E.coli*.

Para o crescimento de bactérias lácticas, Man et al. (1960) publicaram um trabalho no qual propunham a utilização do meio de cultura MRS, em substituição ao usual de Briggs, que utilizava suco de tomate e que não possibilitava o bom crescimento de cepas fastidiosas de algumas espécies de lactobacilos. O MRS constitui-se, basicamente, de peptona (1%), extrato de

carne (0,8%), extrato de levedura (0,4%), glicose (2%), sorbitano monooleato (0,1%), fosfato dipotássico (0,2%), acetato de sódio trihidratado (0,5%), citrato de amônia (0,2%), sulfato de magnésio heptahidratado (0,02%), sulfato de manganês tetra hidratado (0,005%) e ágar (1,5%) (Silva et al., 2001). É o principal meio de cultura utilizado para o cultivo de bactérias do ácido lático.

Para o cultivo de clostrídio sulfito redutor, pode ser utilizado o ágar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS). O meio basal é constituído de triptona (1,5%), extrato de levedura (1,0%), ágar (1,5%) e citrato férrico (0,05%). É realizado um ajuste para pH 7 e o meio é esterilizado. Para cada litro estéril são, então, adicionadas as seguintes soluções: 5mL de sulfito de sódio (10%), 10mL de sulfato de polimixina B 0,1% e 10mL de sulfadiazina de sódio na concentração de 12mg/mL. Esse meio foi derivado do ágar sulfito-ferro, em que os clostrídios reduzem o sulfito que é precipitado como sulfito férrico, formando colônias negras. No entanto, no meio sulfito, outras bactérias, como salmonelas, *Proteus*, *Escherichia freundii*, *Paracolobactrum* e certas espécies dos gêneros *Erwinia*, *Flavobacterium* e *Achromobacter* podem causar a mesma reação. Além disso, alguns anaeróbios facultativos podem crescer neste meio de cultura. Posteriormente, Mossel e colaboradores, em 1959, acrescentaram 0,05% de sulfito de sódio e 10 ppm de polimixina B e conseguiram obter o crescimento de culturas puras de várias espécies de clostrídios. No entanto, quando culturas mistas foram inoculadas, houve o crescimento de enterococos, estafilococos e bacilos aeróbios e a formação de colônias negras por *Proteus*, salmonelas e certos *Paracolobactrum*. Assim, Angelotti e colaboradores, em 1961, baseados em estudos anteriores que mostravam os efeitos da sulfadiazina sobre as enterobactérias, acrescentaram 12 mg/mL desse composto ao ágar de sulfito-polimixina de Mosel para inibir o crescimento das demais bactérias e permitir a formação de colônias negras características apenas por clostrídios (Angelotti et al., 1962).

No entanto, a clássica técnica microbiológica de plaqueamento em ágar, isoladamente, não é completa para o estudo da microbiota intestinal e fecal porque muitas espécies não podem ser isoladas por ela (Rastall, 2004). Além disso, para as que são isoladas, há a necessidade de estudos complementares baseados na caracterização bioquímica e genética. Em laboratórios, a identificação bioquímica é frequentemente baseada na análise computacional de um grande número de testes diagnósticos, realizados com o uso de kits (Mandigan et al., 2004).

Quando não se dispõe dos kits para os ensaios bioquímicos, pode-se lançar mão da realização individual dos testes para confirmação e/ou identificação de microrganismos. Para confirmação de *E. coli*, além da coloração de Gram, há o clássico ensaio de IMViC (Holt et al., 1994).

O IMViC consiste de uma série de quatro ensaios bioquímicos: o do indol, o do vermelho de metila (VM), o Voges Proskauer (VP) e o citrato, que se baseiam nas características de utilização de nutrientes e produção de metabólitos (Holt et al., 1994).

No teste do indol, as bactérias que possuem a enzima triptofanase podem clivar o triptofano e produzir indol, ácido pirúvico e amônia. O indol é detectado pelo aparecimento de cor vermelha após adição do reagente de Kovacs. No teste de vermelho de metila, a produção de ácido láctico, acético e fórmico a partir da glicose por meio da via de fermentação mista leva ao desenvolvimento de uma cor vermelha na superfície do meio, por abaixamento do pH a 4,4. No teste de Voges-Proskauer, a acetoina produzida em maior quantidade por determinados microrganismos (como a *Klebsiella* e o *Enterobacter*) reage com o hidróxido de potássio 40% e converte-se a diacetila que, na presença do alfa-naftol, forma um complexo de cor vermelha. Por fim, no teste do citrato, utiliza-se um meio de cultura (ágar citrato de Simmons ou caldo de Koser) que contém citrato como única fonte de carbono e fosfato de amônio como única fonte de nitrogênio. As

bactérias que podem utilizar o citrato também podem assimilar o nitrogênio a partir do sal de amônia, com produção de amoníaco (NH<sub>3</sub>), o que leva à alcalinização do meio por conversão do NH<sub>3</sub><sup>2+</sup> em hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH). O crescimento das bactérias alcaliniza o meio, que se torna azul acima de pH 7,6 pela presença do indicador azul de bromotimol (Holt et al., 1994).

Na Tabela 3 pode-se observar as características dos principais gêneros de enterobactérias no teste de IMViC.

TABELA 3 Diferenciação de alguns gêneros de enterobactérias pelo IMViC

<b>Gêneros</b>	<b>Indol</b>	<b>VM</b>	<b>VP</b>	<b>Citrato</b>
<i>Escherichia</i>	pos/neg	positivo	negativo	negativo
<i>Enterobacter</i>	negativo	negativo	positivo	positivo
<i>Shigella</i>	pos/neg	positivo	negativo	negativo
<i>Salmonella</i>	negativo	positivo	negativo	pos/neg
<i>Klebsiella</i>	negativo	negativo	pos/neg	positivo
<i>Proteus</i>	pos/neg	positivo	negativo	pos/neg

Adaptado de Mandigan et al. (2004).

No entanto, deve-se levar em consideração que algumas linhagens podem apresentar características atípicas. Dessa forma, a separação dos gêneros deve ser considerada sempre aproximada, já que pode haver uma linhagem que não apresente uma ou outra característica normalmente atribuída ao gênero (Mandigan et al., 2004). Por esse motivo, a identificação precisa de uma determinada espécie bacteriana só é garantida por meio dos testes genéticos, como os que envolvem a amplificação, a detecção e/ou o sequenciamento de regiões do rRNA 16S (Rastall, 2004).

## **2.6 Efeitos dos ácidos graxos de cadeia curta sobre a morfologia intestinal**

Os efeitos dos ácidos graxos de cadeia curta podem ser divididos em aqueles que ocorrem no lúmen e os decorrentes de sua absorção pelas células do intestino. Eles são os principais anions presentes no espaço luminal e são ácidos fracos, com valores de  $pK_a$  de 4,8, cujo aumento diminui o pH da digesta. Constituem importante fonte de energia para os colonócitos, sendo responsáveis por cerca de 50% das necessidades energéticas diárias dessas células (Tellez et al., 2006).

De forma geral, o ácido acético pode ser utilizado como fonte de energia para os músculos, os rins, o coração e o cérebro; o ácido propiônico, como combustível para a gliconeogênese no fígado e o butírico, como a principal fonte de energia para os enterócitos/colonócitos (Cummings et al., 1995, citados por Ferket et al., 2002).

Além da nutrição, diversas outras ações sobre o intestino são atribuídas a essas substâncias, incluindo a alteração do fluxo sanguíneo e da atividade muscular no cólon, a proliferação de enterócitos e a estimulação da produção de mucina.

Em relação ao fluxo sanguíneo, há um aumento da circulação por meio de mecanismos que envolvem a ação simultânea do sistema nervoso e de quimorreceptores sobre as células da camada muscular, melhorando a oxigenação tecidual e o transporte de nutrientes. Embora sejam produzidos no cólon como metabólitos das bactérias, os ácidos graxos entram na circulação portal e influenciam também as funções do intestino delgado (Tellez et al., 2006). Foi demonstrado que a perfusão do cólon de cães com uma combinação de ácidos graxos (acetato, 75mM, propionato, 30mM e butirato, 30mM) aumentou o fluxo sanguíneo e a absorção de oxigênio. Entre os três ácidos, apenas o acetato foi capaz de mimetizar os efeitos hemodinâmicos, quando

aplicado isoladamente. Além disso, o acetato foi capaz de estimular a motilidade das alças do íleo (Scheppach, 1994).

Já o butirato tem uma ação importante, no que se refere à proliferação de células epiteliais. No entanto, essa influência é diferente em células normais e cancerígenas: ele reduz a proliferação e a diferenciação em células tumorais, mas, paradoxalmente, aumenta a de células normais. O butirato parece ter um papel importante como agente anticarcinogênico no cólon. A tumorigênese é um processo multifatorial com a progressão de um epitélio hiperproliferativo para um carcinoma pré-invasivo e metastático via formação de criptas aberrantes e vários estágios de displasia. As alterações genéticas estão envolvidas em cada passo, mas seus determinantes são incertos e não está claro se o butirato se opõe a alguns ou a todos eles.

A maior proliferação das células intestinais provocada pela ação do butirato é um paradoxo que poderia, por si só, aumentar o risco de formação de tumor. No entanto, a ação que ele tem sobre a apoptose de células normais e tumorais desmente essa hipótese. Na ausência do butirato, as células colônicas, normais em cultura, entram em apoptose dentro de 150 minutos, com um aumento paralelo de cinco vezes na expressão da proteína Bax. Em contraste, o butirato leva a um aumento do crescimento, da diferenciação e da apoptose de linhas de células relacionadas ao aparecimento de tumor. A diferenciação é seguida por um aumento da expressão de glicoproteínas nas células da membrana borda em escova, fosfatase alcalina e antígeno carcinoembrionário. As células colônicas normais mostram uma diminuição na expressão desses marcadores após terem sido incubadas com butirato. As células SW620 pararam o processo de mitose, nas fases G0-G1 e G2-M, 12 horas após a exposição ao butirato, com apoptose 4 horas mais tarde, fato que foi relacionado a uma diminuição na cadeia de transporte mitocondrial de elétrons. Também já foram

relatados aumentos na fosfatase alcalina, sugerindo que a morte programada ocorre, subseqüentemente, após a diferenciação.

Um dos possíveis mecanismos para a diferenciação de células tumorais *in vitro* é a redução nos níveis nucleares de proto-oncogene *c-myc*, um fator importante para o crescimento de tumores. O tratamento com o butirato também reduz a atividade de proteína tirosina-quinase associada ao citoesqueleto, que é importante nas respostas celulares a citocinas, tais como fator de crescimento beta-1. A inibição da síntese de DNA pode ocorrer através da inibição da histona deacilase, com a remoção de histonas que são o primeiro passo na replicação de DNA. Apoptose pode ser ponto chave em impedir a progressão de adenomas de cólon para carcinomas devido a mutações nos genes, tais como p53, o qual controla a morte celular programada. A apoptose é melhorada pelo butirato, mas não através desse gene. Acetato e propionato também podem induzir apoptose, mas em menor extensão e em altas concentrações (40mM) (Topping & Clifton, 2001).

O butirato age diretamente sobre a inibição e a estimulação da expressão de 25 e 88 genes, respectivamente, o que culmina, entre outros efeitos, com a diminuição nos níveis de ciclina 1 e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e aumento nos de integrina B1 e osteopontina. O gene que estimula a síntese de osteopontina, uma glicoproteína adesiva, produzida por muitos tecidos e que está presente no glicocálix e nos grânulos secretórios das células mucosas, parece ser o mais responsivo ao butirato. Isso sugere que este ácido graxo de cadeia curta possui um papel importante na manutenção da integridade da barreira. A integrina b1, um membro da família das integrinas, tem muitas funções biológicas, incluindo adesão, migração, proliferação e diferenciação. A adesão à fibronectina, por meio da integrina alfa-5-beta-1, capacita as células endoteliais para proliferar em resposta aos fatores de crescimento, enquanto a adesão à laminina por meio de alfa-2-beta-1 resulta em crescimento sob as

mesmas condições. Assim, o butirato parece atuar na cascata de sinalização através da laminina e da integrina (Tabuchi et al., 2002).

Embora a redução no metabolismo do butirato pelas células do cólon seja um dos fatores etiológicos para o desenvolvimento de tumores (Finnie et al., 1995), a ação anticarcinogênica que ele desempenha está relacionada à disponibilidade de outras fontes de energia. Em condições de cultura padrão (contendo 25mM de glicose e 1mM de piruvato), sua baixa concentração inibe o crescimento e induz a apoptose. No entanto, em meio com depleção de glicose (meio padrão sem suplementos de glicose e piruvato), há redução de apoptose induzida pela privação de glicose e aumento da produção celular. Os resultados mostram que, em culturas com depleção de glicose, o butirato, em baixas concentrações, 0,5mM, estimulou a multiplicação, mas, na presença de glicose, essas concentrações induziram a apoptose (Singh et al., 1997).

Outro efeito atribuído ao butirato é o estímulo à produção de mucina. A concentração de ácido butírico que estimula a síntese máxima dessa glicoproteína é cerca de cem vezes menor do que a encontrada no lúmen do cólon em seres humanos. No entanto, a concentração na circulação portal, a que efetivamente banha as células epiteliais, é bem menor do que a encontrada no lúmen. Inibidores da betaoxidação, como o bromo-octonato de sódio, podem inibir a produção de muco. A depleção de células caliciformes é uma característica histológica de animais que possuem colite ulcerativa e a produção de mucina não é suficiente para acompanhar a grande taxa de renovação celular. O aumento da síntese de mucina aumenta a proteção do butirato à mucosa e isso permite reduzir a taxa de replicação, impedindo a ligação dos fatores de crescimento luminal que podem ser dietéticos ou secretados localmente.

O aumento na síntese de mucina induzida pelo butirato, provavelmente, reflete um importante modo de ação terapêutico, bem como uma função fisiológica (Finnie et al., 1995). No cólon proximal, um aumento na

concentração de butirato alterou a profundidade da cripta e o número de células contendo muco, especialmente as com mucinas neutras (Tellez et al., 2006).

### **2.7 Modulação da microbiota intestinal pelo extrato de parede de levedura**

O mecanismo de ação do mananoligossacarídeo presente no extrato de parede de levedura na seleção da microbiota intestinal é diferenciado em relação aos outros oligossacarídeos utilizados como prebióticos, havendo, inclusive algumas divergências em relação à sua classificação como tal.

Gibson & Roberfroid (1995) postularam que um prebiótico seria um ingrediente não digerível que estimula seletivamente o crescimento e/ou atividade de um limitado número de bactérias no cólon, melhorando, dessa forma, a saúde do hospedeiro. Assim, para ser classificada como prebiótico, a substância não deve ser hidrolisada ou absorvida na porção superior do trato gastrointestinal. Ela precisa ser um substrato seletivo para uma ou um número limitado de bactérias comensais, que são estimuladas para crescer ou são metabolicamente ativadas; ser capaz de alterar a microbiota em favor de uma composição mais saudável e induzir os efeitos locais ou sistêmicos que são benéficos à saúde do hospedeiro.

Diversos ingredientes passaram, então, a ser empregados como prebiótico, sem que a consideração à definição fosse seguida. Muitos oligossacarídeos e polissacarídeos são assim classificados (incluindo as fibras), mas nem todos os carboidratos possuem atividade prebiótica característica. Dessa forma, Gibson et al. (2004) simplificaram o conceito, definindo prebióticos como ingredientes que resistem à acidez gástrica, à hidrólise pelas enzimas e à absorção; são fermentados pela microbiota e estimulam, de forma seletiva, o crescimento e/ou a atividade intestinal associada à saúde e ao bem-estar. Tendo em vista esses três critérios, os autores concluíram que não há

evidências suficientes para classificar o mananoligossacarídeo como uma substância com atividade prebiótica.

Um dos pontos que ainda necessitam de um maior número de estudos é sua capacidade de fermentação. Hussein & Healy (2001), citados por Swanson & Fahey Junior (2002), realizaram um ensaio para avaliar a capacidade de fermentação do MOS pela microbiota de cães e gatos e, para isso, os substratos foram incubados, a 39°C, por cerca de 6, 12, 18 e 24 horas. Embora tenham sido realizados brancos para cada um dos tempos, não foram testados os padrões de fermentação das amostras e de tubos brancos na hora zero. O desaparecimento da matéria seca e da matéria orgânica, bem como a concentração de ácidos graxos e lactato, foi mensurado e utilizado como índices de fermentabilidade. Não houve diferenças de fermentabilidade entre as espécies e os testes de desaparecimento da matéria seca (54,3%, 57,9%, 60,7% e 61,3%, para as horas 6,12,18 e 24, respectivamente) e orgânica (56,8%, 60,7%, 63,7% e 64,1%, na mesma situação) demonstraram que o MOS apresentou boa capacidade de fermentação.

No entanto, essa metodologia não reflete de maneira acurada a fermentação microbiana, porque essa técnica leva à perda de carboidratos solúveis presentes nos substratos e que não são retidos durante a filtração. Dessa forma, embora esses carboidratos estejam disponíveis para a fermentação, os métodos gravimétricos não podem determinar se eles foram utilizados pelos microrganismos como fonte de energia. Além disso, essa metodologia não é tão precisa quanto a de mensuração dos ácidos graxos de cadeia curta, que é uma medida direta para a avaliação dos processos de fermentação. As concentrações de ácidos graxos totais foram moderadas (10,1; 26,8; 36,7 e 49,7mM, nos tempos 6, 12, 18 e 24 horas) e, quando comparadas aos ácidos graxos totais, a concentração de lactato foi bastante alta (7,7; 8,7; 7,6 e 5,9mM, nos mesmos

períodos) sugerindo fermentação por bactérias produtoras de ácido láctico como os lactobacilos e as bifidobactérias.

No entanto, apesar de apresentar esse potencial para fermentação, os resultados ainda são inconclusivos e, quando comparados a outras substâncias classificadas como prebióticos, como a inulina e o FOS, essa capacidade seria apenas moderada. Vickers et al. (2001) realizaram um estudo sobre a habilidade *in vitro* de diversas fibras (polpa de beterraba, celulose, fibra da soja, mananoligossacarídeo, frutoligossacarídeos e quatro produtos derivados da inulina) para serem utilizadas em reações de fermentação da microbiota intestinal de cães e gatos. Eles incubaram cada substrato anaerobicamente com inóculo fecal e mensuraram o crescimento médio, além da produção de AGCC, após 6,12 e 24 horas. Eles puderam constatar que a produção total de ácidos graxos de cadeia curta, bem como de lactato, foi maior para o FOS e a inulina, e que o MOS levou apenas a um aumento moderado destes.

Diante desse cenário, embora haja algumas evidências de que o mananoligossacarídeo possa funcionar como substrato para determinadas espécies bacterianas, esse não é o seu principal modo de ação. Na realidade, a sua atuação principal é como um sítio de ligação para determinadas bactérias gram-negativas, impedindo o seu acoplamento à superfície das células intestinais. Isso acontece devido à constituição particular destas, que apresentam resíduos de D-manose em suas fimbrias. Patógenos com fimbria tipo 1 manose-específica adsorvem o MOS prontamente e deixam o intestino sem possibilidade de colonizá-lo (Ferket et al., 2002).

Os pilli bacterianos podem ou não ser inibidos pelas alfa-manosidasases, reconhecendo ou não receptores de manose e, então, ser divididos em manose sensíveis (MS) ou resistentes (MR). As manoses resistentes correspondem a um grande grupo de adesinas que podem variar grandemente em relação à composição, aparência morfológica, determinação genética ou especificidade de

receptores. Algumas *E. coli* enterotoxigênicas e uropatogênicas são MR. Geralmente, as *E. coli* MR aderem a células epiteliais, mas muito menos às culturas celulares, ao passo que as manoses sensíveis aderem a muitas culturas de tecidos e também as glicoproteínas do trato urinário, a Tamm Horsfall. As sensíveis mediam a adesão de *E. coli* às células fagocíticas, presumivelmente via estruturas contendo manose da membrana plasmática (Blumenstock & Jann, 1982).

Ofek & Beachey (1978) utilizaram culturas de *E. coli* para avaliar a capacidade de ligação destas às células epiteliais. Eles separaram as culturas aderidas e diluíram-nas com metil-D-manopirosina. Quando essas bactérias foram separadas do açúcar, elas possuíam alto grau de atividade de ligação à manose e apresentavam pili, contrastando com a fração não aderente, que não possuía ambos. Assim, a presença de uma lectina na superfície da *E. coli* pode ser quantificada em organismos intactos e as variações observadas na atividade de ligação a manose entre os isolados contribuem para as diferenças na adesão de microrganismos aos resíduos desse açúcar presentes nas células epiteliais.

Em frangos, em um estudo realizado por Finucane et al. (1999), verificou-se que 68% das cepas de *E. coli* isoladas dos animais e 53% das espécies de *Salmonella* sp. testadas possuíam esse tipo de fimbria.

O estudo *in vitro* realizado com receptores de manose revelou que estes também podem se ligar a polissacarídeos capsulares purificados de *Streptococcus pneumoniae*. Essa ligação depende de cálcio e da conformação do polissacarídeo e os domínios transmembrana 4 e 7 são responsáveis pelo reconhecimento. A forma solúvel do receptor de manose também parece ser capaz de se ligar simultaneamente a dois polissacarídeos bacterianos via reconhecimento do domínio CHO e dos oligossacarídeos sulfatados via domínio rico em cisteína (Zamze et al., 2002).

Considerando todas as informações descritas, pesquisas começaram a ser realizadas para avaliar a capacidade do mananoligossacarídeo em modular a microbiota intestinal de diversas espécies. Nesses estudos, tem-se demonstrado o potencial desta substância em selecionar populações bacterianas, mas há divergências quanto a esses resultados.

Em suínos recém-desmamados, a adição de 0,2% de MOS à dieta diminuiu a concentração de enterobactérias (Castillo et al., 2008). Em frangos de corte, uma série de experimentos conduzidos por Spring et al. (2000) demonstraram que o MOS possui capacidade para reduzir a concentração de *Salmonella typhimurium* e de *S. dublin* no intestino desses animais. No entanto, as concentrações de coliformes, enterococos, lactobacilos e bactérias anaeróbias totais não foram alteradas. Também em frangos de corte, Baurhoo et al. (2007) relataram que a utilização de 0,1% de MOS possibilitou um aumento na população de *Lactobacillus* para aves aos 38 dias de idade. As bifidobactérias também apresentaram maior concentração em animais com 28 e 38 dias. Por outro lado, o número de *E. coli* foi menor, aos 9 dias, com a adição de 0,2% de mananoligossacarídeo à dieta dos frangos, quando comparado ao controle negativo (apenas com a dieta basal) e positivo (dieta basal + 11 mg/kg do antibiótico virgimamicina).

Em perus, Zdunczyk et al. (2005) relataram que a adição de até 1% de MOS não alterou significativamente as populações de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no entanto, diminuiu a concentração de *E. coli*, especialmente em tratamentos contendo níveis médios (até 0,4%) e altos (até 1%) de mananoligossacarídeo. Também em perus, Sims et al. (2004) relataram que 0,1% de MOS diminuiu a população de *Clostridium perfringens* às seis semanas de idade.

Para cães, Swanson et al. (2002) verificaram que a utilização de 0,3 % de MOS diminuiu a concentração de aeróbios totais ( $8,67 \times 7,68 \log \text{ UFC/g de MS}$

fezes com  $p = 0,054$ ) e aumentou a de *Lactobacillus* ( $8,48 \times 9,16$  log UFC/g de MS fezes com  $p = 0,126$ ). No entanto, as concentrações de anaeróbios totais, *Bifidobacterium*, *E. coli* e *C. perfringens* não foram alteradas com a sua suplementação. Já Middelbos et al. (2007), ao realizarem a suplementação de diferentes níveis (0,0%, 0,05%, 0,25%, 0,45% e 0,65%) de parede celular de levedura íntegra na dieta de cães adultos encontraram efeito linear negativo sobre a *E.coli*, com diminuição da população dessa espécie bacteriana nas fezes dos animais conforme houve aumento do mananoligossacarídeo na dieta.

Grieshop et al. (2004), ao estudarem os efeitos da suplementação de mananoligossacarídeo para cães senis, verificaram que a adição de 1% deste à dieta aumentou em  $0,5 \log_{10}$  de UFC/g de matéria seca de fezes a concentração de bifidobactérias, além de diminuir a população de *E.coli*, quando comparados a animais não suplementados.

Ainda em cães, além da efetividade sobre a modulação da população microbiana de animais saudáveis, alguns estudos têm demonstrado que o MOS pode atuar como um coadjuvante no tratamento de doenças do trato gastrointestinal. Quando foi utilizado em conjunto com a terapia medicamentosa (que consistiu de enrofloxacina, cloridrato de metoclopramida, praziquantel, pirantel e fluidoterapia com ringer lactato e solução fisiológica 0,9%, além de tiamina e cianocobalamina), observou-se que, no grupo tratado com MOS, houve a eliminação da *Escherichia coli* patogênica em 85,71% dos animais, enquanto que, nos cães não tratados, somente 25% não apresentaram o microrganismo (Gouveia et al., 2006).

Em relação aos felinos, não foram encontrados, na literatura indexada, trabalhos que demonstrem o efeito de mananoligossacarídeo na modulação da microbiota intestinal.

## **2.8 Extrato seco de parede de levedura e efeitos secundários sobre os sistemas fisiológicos**

### **2.8.1 pH e concentração de ácidos graxos de cadeia curta**

A maioria dos estudos com extrato seco de parede de levedura, nos quais a mensuração de AGCC foi realizada, se refere às espécies destinadas à produção. Em perus, a utilização de 0,4% e 1,0% de MOS para aves de oito e de 0,2% e 0,4% para animais de 16 semanas causou uma diminuição na concentração de ácidos graxos totais, especialmente pela redução nos teores de ácido acético na digesta cecal. No entanto, o ácido propiônico, bem como o butírico, não foi alterado pela utilização deste na dieta (Zdunczyk et al., 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Juśkiewicz (2006), em trabalho com a mesma espécie. Já Ferket et al. (2002), citados por Zdunczyk et al. (2005), haviam encontrado concentrações totais 40% menores de AGCC na digesta jejunal em perus suplementados com MOS, mas, neste caso, esta diminuição se deu especialmente pelos teores mais baixos de ácido propiônico, decorrentes da alteração do padrão de fermentação pela modulação da microbiota.

Em suínos, ao compararem as características de fermentação *in vitro* de alguns oligossacarídeos (frutoligossacarídeo de cadeia longa, média e curta, rafinose, estaquiose, soja solúvel, formas líquidas e granulares de transgalactoligossacarídeo, gluco-oligossacarídeo, mananoligossacarídeo e xiloligossacarídeo), Smiricky-Tjardes et al. (2003) constataram que a produção total de ácidos graxos de cadeia curta em animais suplementados com MOS foi mais baixa em relação aos demais oligossacarídeos.

Swanson et al. (2002), trabalhando com MOS para cães, não encontraram diferenças nas concentrações de ácido acético, propiônico e butírico, bem como do ácido láctico, ao realizarem a suplementação com 0,3% de mananoligossacarídeo na matéria seca da dieta desses animais. Nesse estudo,

houve um aumento do pH fecal de 6,76 para 7,27 ( $p = 0,088$ ), nos cães suplementados, em relação aos animais recebendo a dieta controle.

Zentek et al. (2002), ao avaliarem efeitos de diferentes oligossacarídeos para cães, encontraram aumento significativo da suplementação de MOS na concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (41,3  $\mu\text{mol/mL}$  para animais suplementados com MOS x 26,8  $\mu\text{mol/mL}$  do tratamento controle) que foi confirmada por uma diminuição no pH fecal de 6,9 para 6,6 com o uso deste. No entanto, o MOS, quando comparado aos transgalactoligossacarídeos (36,4  $\mu\text{mol/mL}$ ), à lactose (33,1  $\mu\text{mol/mL}$ ) e à lactulose (41,8  $\mu\text{mol/mL}$ ), não diferiu na produção total de AGCC.

Middelbos et al. (2007), ao testarem cinco níveis de parede de levedura (0%, 0,05%, 0,25%, 0,45% e 0,65% da dieta oferecida) para cães, encontraram efeito cúbico para o pH, tendo o valor mais baixo sido obtido no nível de 0,45%. Neste tratamento, havia concentração muito alta de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, o que poderia explicar a queda de pH pela produção de ácido láctico e AGCC.

Embora não haja estudos avaliando os efeitos diretos da ação de MOS sobre os ácidos graxos de cadeia curta em felinos, uma pesquisa mensurou as concentrações dessas substâncias em diversas porções do trato gastrointestinal de animais recebendo apenas alimento comercial seco, o que pode funcionar como parâmetro. Para isso, Brosey et al. (2000) utilizaram 14 gatos e mensuraram as porcentagens de ácido acético, propiônico e butírico no estômago, no duodeno, no jejuno, no íleo e nas porções proximal e distal do colon. O valor total de ácidos graxos de cadeia curta, considerando todas as porções do trato gastrointestinal, foram inferiores a 600  $\mu\text{mol}$ , que é mais baixo do que o normalmente encontrado em outras espécies de animais monogástricos. Isso, inicialmente, seria explicado pelo intestino curto, característico dos animais carnívoros. No entanto, os valores encontrados nas porções proximal e distal do

cólon, de 109 e 131 mmol/L, respectivamente, são compatíveis com os observados em outros animais monogástricos, respectivamente. O pH variou de acordo com a região do trato gastrointestinal, sendo mais baixo no estômago, aumentando no intestino delgado e baixando novamente na região do cólon.

### **2.8.2 Volume de produção de gás**

Sabe-se que a utilização de fibras muito fermentáveis ou de concentrações elevadas de prebióticos pode gerar excessiva produção de gás, com a presença de flatos e diarreia. Isso porque o aumento no número de ácidos graxos de cadeia curta eleva a concentração osmótica, predispondo ao extravasamento de líquido para o lúmen do intestino. Além disso, os animais podem apresentar desconforto intestinal provocado por distensão, flatulência, aumento da motilidade intestinal e cólicas, como consequência do aumento da pressão osmótica intraluminal e irritação da mucosa intestinal (Sunvold et al., 1993, citados por Borges et al., 2003). Assim, saber qual a dose adequada para a suplementação de substâncias moduladoras da microbiota e qual o efeito dessas doses sobre a produção de gases é essencial para o sucesso dessa estratégia nutricional.

#### **2.8.2.1 Metodologias para mensuração de gás intestinal**

Experimentalmente, algumas técnicas têm sido utilizadas para a mensuração do gás proveniente de amostras fecais. Em animais de companhia, a incubação de amostras frescas de fezes para a realização de ensaios de fermentação em atmosfera modificada tem sido adotada. No entanto, essas técnicas *in vitro* podem sofrer interferências e não fornecer informações reais sobre a produção de gases nos animais.

Por esse motivo, Feliciano (2008), utilizando a radiografia e um programa computacional, o Image J<sup>®</sup> (Image Processing Analyses in Java),

mensurou as áreas de gás nas alças intestinais de cães da raça Beagle submetidos a tratamentos com probióticos.

O Image J<sup>®</sup> foi desenvolvido pelo projetista Wayne Rasband, do National Institute of Health e pode processar, salvar e imprimir imagens em 8,16 e 32 *bits* de diversos formatos, tais como tiff, gif, jpg e bmp. Além disso, calcula áreas e valores em pixels de regiões selecionadas, o que permitiu a sua utilização para a mensuração das áreas radiotransparentes, representadas pelos gases no trabalho de Feliciano. Até então, a mensuração de áreas de gás não havia sido desenvolvida em medicina veterinária, estando restrita apenas a seres humanos e tendo sido realizado por Koide et al. (2000).

O procedimento realizado por Feliciano foi repetido pelo mesmo grupo de pesquisa por Maia (2008) para avaliar a produção de gás em animais submetidos a tratamentos com *Yucca schidigera* e zeólita. Durante a realização deste trabalho, os pesquisadores notaram que ajustes seriam necessários para a leitura das imagens no Image J<sup>®</sup>. Isso porque o programa trabalha com contraste de regiões claro/escuro e algumas áreas, como tecidos moles, presentes na radiografia poderiam ser identificadas como gás, levando a resultados errôneos. Por esse motivo, a adoção de um tratamento prévio das imagens parece importante para minimizar os artefatos nesta técnica de mensuração.

#### **2.8.2.2 Extrato seco de parede de levedura e produção de gás**

Em um estudo realizado com suínos, Smiricky-Tjardes et al. (2003) verificaram que a taxa de produção de gás em amostras provenientes de animais que receberam mananoligossacarídeo foi de 14,9mL/g de matéria orgânica por hora, tendo demorado 8,3 horas para atingir a sua taxa máxima de produção.

Zentek et al. (2002) encontraram maior produção de gás em dietas suplementadas com MOS para cães em relação à dieta basal fornecida antes do início da suplementação (12,5 x 5,5mL), mas não produziu concentrações

significativamente distintas, em comparação a transgalactoligossacarídeos, lactose ou lactulose (15,5, 13,5 e 13,3mL, respectivamente).

### **2.8.3 Morfologia intestinal**

Conforme mencionado em itens anteriores, a maior produção de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente de butirato, tem efeito sobre a mucosa intestinal, levando à hiperplasia e à hipertrofia de colonócitos (Case et al., 1998). Esse efeito com a utilização de MOS seria obtido a partir da modulação da microbiota intestinal.

#### **2.8.3.1 Técnicas para a coleta de material e avaliação da morfologia intestinal**

A avaliação dos efeitos de substâncias sobre a morfologia intestinal em estudos com animais de companhia é difícil, devido à necessidade do uso de técnicas invasivas para a coleta de material.

No entanto, o desenvolvimento das ferramentas de diagnóstico por imagem na medicina veterinária, especialmente da colonoscopia, permite, hoje, uma avaliação ampla da mucosa intestinal desses animais e ainda possibilita a coleta de material para análise, fornecendo informações valiosas (Trindade et al., 2008).

A colonoscopia é uma técnica endoscópica minimamente invasiva do cólon e da parte distal do intestino delgado, realizada com o auxílio de uma câmera com fibra óptica, acoplada a um tubo flexível. É constituído por um sistema de irrigação e insuflação e as imagens captadas são transferidas para um monitor de vídeo, o que permite a inspeção do órgão em tempo real. É possível a introdução de material acessório em um compartimento denominado canal de biópsia, que possibilita a utilização de pinças para a realização de coletas de material intestinal (Dayot et al., 2008). Dessa forma, podem-se realizar os

exames histológicos e citológicos que permitem avaliar as possíveis alterações provocadas pela utilização de uma determinada substância.

Poucos estudos sobre a anatomia e a histologia do intestino de felinos saudáveis estão disponíveis. Sturgess et al. (2001) realizaram uma pesquisa para avaliar as características morfológicas microscópicas e anatômicas do cólon de 35 felinos saudáveis. Estes autores verificaram que o comprimento do cólon em relação ao total do intestino é relativamente constante e equivale a cerca 20,9%. No entanto, observaram grande variação individual na profundidade das criptas (149–688µm) e que estas se apresentavam mais profundas conforme foram afastadas do ânus. A maior proliferação celular ocorre na porção mais inferior das criptas e também é maior quanto mais longe do ânus elas estiverem. Como alternativa para diminuir as diferenças individuais, recomenda-se a coleta nessas regiões mais craniais. De qualquer forma, é necessário ter em mente a grande variabilidade dessas medidas, quando se trabalha com essas variáveis.

Uma forma indireta utilizada para avaliar a mucosa e a espessura de parede intestinal é a ultrassonografia. Cinco camadas podem ser normalmente identificadas no exame ultrassonográfico do intestino: a face da mucosa, mucosa, submucosa, muscular e subserosa/serosa. Todas elas estão presentes no trato intestinal dos felinos. A espessura média da parede do cólon é de cerca de 1,67mm (Newell et al., 1999).

#### **2.8.3.2 Extrato seco de parede de levedura e morfologia intestinal**

White et al. (2002), ao realizarem a suplementação de extrato seco de levedura para leitões recém-desmamados, não encontraram alterações na profundidade de criptas, na altura de vilos, bem como na relação cripta:vilo, quando comparada ao tratamento controle, indicando que não houve aumento aparente na proliferação ou no tamanho de células epiteliais.

Com a mesma espécie, Castillo et al. (2008) verificaram que a suplementação de MOS não alterou as características morfológicas do jejuno dos animais, assim como o número de células caliciformes nas criptas e nas vilosidades.

Em frangos de corte, Pelicano et al. (2003), ao avaliarem a suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* e probióticos à base de *Lactobacillus* sp. e *Bacillus* sp., encontraram diferenças significativas da suplementação, em comparação às dietas padrão. Também em frangos de corte, Yang et al. (2007) igualmente não verificaram efeitos da adição de MOS à dieta sobre a morfologia de jejuno e íleo desses animais, aos 14 e aos 35 dias.

Não foram encontrados, na literatura indexada, trabalhos avaliando o efeito de MOS sobre a morfologia intestinal de cães ou gatos.

## **2.8.4 Extrato seco de parede de levedura, digestibilidade dos nutrientes e escore fecal**

### **2.8.4.1 Digestibilidade dos nutrientes e da energia**

Os valores de digestibilidade dos nutrientes fornecem informações sobre as quantidades relativas de nutrientes da dieta que podem ser utilizados com finalidade produtiva e, adicionalmente, servem como um índice de qualidade total de ingredientes de dietas para animais de companhia (National Research Council, 2006). A importância de sua determinação é bem conhecida, já que dois alimentos com a mesma concentração de nutrientes podem diferir grandemente na digestibilidade e no aproveitamento destes (Ahlstrøm & Skrede, 1998).

Por esse motivo, o papel de substâncias prebióticas e probióticas sobre a digestibilidade de nutrientes é bastante estudado. A ação dos microrganismos no trato digestório influencia a quantidade, a biodisponibilidade e a digestibilidade de alguns nutrientes da dieta. Em seres humanos, por exemplo, a fermentação de

produtos lácteos por bactérias lácticas pode aumentar a concentração de determinados nutrientes, como vitaminas do complexo B. Da mesma forma, a hidrólise enzimática bacteriana pode aumentar a digestibilidade de proteínas e de gordura, além da liberação de aminoácidos livres (Saad, 2006).

Neste contexto, diversos trabalhos, nas mais variadas espécies, têm sido realizados para avaliar a digestibilidade dos nutrientes em dietas contendo mananoligossacarídeos.

Utiyama (2004), estudando o efeito do MOS sobre a digestibilidade de nutrientes e da energia em leitões recém-desmamados, verificaram que o mananoligossacarídeo promoveu um maior aproveitamento da matéria seca e da energia bruta. No entanto, a digestibilidade da proteína não foi alterada.

Oliveira et al. (2007), ao utilizarem 0,1% de MOS para frangos de corte, encontraram coeficiente de digestibilidade ileal da matéria seca, retenção de matéria seca, proteína bruta, cálcio e fósforo, energia digestível e energia metabolizável aparente superiores em relação à dieta controle.

Middelbos et al. (2007), empregando cinco níveis de parede de levedura (0%, 0,05%, 0,25%, 0,45% e 0,65% da dieta oferecida) para cães, observaram efeito cúbico na digestibilidade aparente da matéria seca (83,0%, 82,1%, 80,0%, 83,2% e 81,2%), da matéria orgânica (88,7%, 88,0%, 86,7%, 88,8% e 87,3%), da proteína bruta (85,0%, 84,1%, 82,8%, 85,6% e 83,6%), do extrato etéreo ácido (95,6%, 95,3%, 95,1%, 95,7% e 95,1%) e da energia bruta (89,6%, 89,0%, 87,8%, 89,7% e 88,5%). O mesmo padrão foi observado com a digestibilidade ileal desses nutrientes e da energia. Dessa forma, a digestibilidade total de cada um deles foi mais baixa no nível de 0,25%. Os autores explicam que, devido à capacidade do MOS de alterar o número de bactérias lácticas, a digestibilidade da proteína pode estar diminuída e, dessa forma, haveria reflexos na digestibilidade da matéria seca, da matéria orgânica e, possivelmente, da energia. Esse último efeito poderia ser explicado pelo fato de

a energia utilizada para a síntese de células bacterianas ser perdida pelo animal, mas recuperada nas fezes.

Quanto à relação ingerido/excretado, ela foi mais baixa no nível de 0,45%, com 0,30 g de fezes produzidos para cada grama de alimento ingerido. Como as concentrações de MS das fezes foram iguais entre os tratamentos, há indicação de um efeito quadrático da suplementação de parede de levedura sobre a excreção.

Swanson et al. (2002), ao suplementarem 0,3% de mananoligossacarídeo na matéria seca do alimento consumido para cães adultos, também verificaram diminuição da digestibilidade ileal da matéria seca, da matéria orgânica e da proteína bruta e sugeriram que tal efeito poderia ocorrer devido a uma ligação do MOS às proteínas, com possível aglutinação destas.

Zentek et al. (2002), ao utilizarem cerca de 5,88% de MOS, observaram diminuição da digestibilidade da matéria seca, da proteína bruta e dos extrativos não nitrogenados em relação ao retorno a dieta basal fornecida logo após o período de suplementação e quando comparadas ao transgalactoligossacarídeo, à lactose e à lactulose.

#### **2.8.4.2 Escore fecal**

O escore fecal é uma medida qualitativa, normalmente associada à digestibilidade do alimento. É uma ferramenta bastante utilizada pelos nutricionistas para verificar a qualidade das fezes, que é importante para o proprietário de animais de companhia. Existem basicamente dois sistemas de escore, mas ambos correspondem a uma escala que varia de 1 a 5. Estes estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 Graduações de escore fecal em nutrição de cães e gatos

<b>Escore <sup>1</sup></b>	<b>Característica</b>
1	Fezes líquidas, diarreia
2	Fezes pastosas e sem forma definida
3	Fezes macias e bem formadas, úmidas, mas que mantêm o formato
4	Fezes duras, secas, firmes, macias e bem formadas
5	Fezes muito duras e ressecadas

<b>Escore <sup>2</sup></b>	<b>Característica</b>
1	Fezes muito duras e ressecadas, pequenas e secas
2	Fezes duras, secas, firmes, macias e bem formadas
3	Fezes macias, bem formadas, úmidas, mas que mantêm o formato
4	Fezes macias, sem forma definida
5	Fezes líquidas

<sup>1</sup>Zentek et al. (2002), <sup>2</sup>Swanson et al. (2002) e Middelbos et al. (2007).

Alguns trabalhos avaliaram o escore fecal de animais suplementados com extrato seco de parede de levedura. Na pesquisa de Middelbos et al. (2007), o escore apresentou tendência a efeito quadrático ( $p=0,12$ ), sendo o menor valor obtido com 0,25% de MOS (1,8), seguido pelo controle e 0,45% (ambos com 1,9).

Já Swanson et al. (2002) não encontraram diferenças significativas, tendo o escore sido de 2,9 segundo a escala 2, o mesmo resultado encontrado por Zentek et al. (2002), com escore de 3,6 segundo a escala 1.

No trabalho de Swanson et al. (2002), o resultado obtido pelo escore pode ser confirmado pela porcentagem de matéria seca das fezes que também não foi alterada com a utilização de mananoligossacarídeo (com valores de 38,2% para o MOS x 38,0% para o controle).

### **2.8.5 Redução de odor de fezes**

O odor de fezes, assim como o escore, também é uma variável intrínseca explícita importante dentro da matriz da qualidade de alimentos para animais de companhia e pode influenciar a decisão do proprietário na escolha dos produtos para o gato (Boari, 2007). Assim, a busca por aditivos que minimizem o odor das fezes é prática comum no mercado de alimentos para animais de estimação.

Diversas substâncias, tais como aminas, sulfitos, ácidos graxos, ésteres, aldeídos e cetonas, estão envolvidas na caracterização e na intensidade do odor das fezes (Lowe et al., 1997). Dessa forma, a mensuração desses compostos tem sido aplicada como maneira de verificar o potencial para a redução desse odor.

Swanson et al. (2002) avaliaram a concentração de aminas biogênicas (agmatina, cadaverina, feniletilamina, putrescina, espermidina, espermina, triptamina, tiramina e histamina), indóis, fenóis e amônia nas fezes de cães suplementados com extrato seco de parede de levedura e não encontram efeito na diminuição desses compostos com a utilização isolada desse aditivo. No entanto, a associação com frutoligossacarídeo promoveu uma diminuição na concentração total de indóis + fenóis que variou de 3,03 $\mu$ mol/g a 1,54 $\mu$ mol/g de matéria seca. O mesmo ocorreu com os indoles que apresentaram uma tendência à diminuição com o uso de FOS isolado (2,44 x 1,23 $\mu$ mol/g de matéria seca;  $p=0,074$ ) ou em associação com o EPL-MOS (2,44 x 1,27 $\mu$ mol/g de matéria seca; 0,082).

Além da mensuração de compostos químicos, alguns trabalhos avaliaram a redução de odor a partir da percepção sensorial. Esse recurso foi utilizado por

John Lowe et al. (1997) para avaliar os efeitos da *Yucca schidigera* nesse propósito. No Brasil, Maia (2008) adaptou a metodologia de Morales, apresentada no livro “La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría e la práctica”, para testar aditivos utilizados para a redução de odores (*Yucca schidigera* e clinoptilolita, uma zeólita). Não foi encontrado nenhum trabalho, na literatura indexada, que utilizasse essa metodologia para a avaliação dos efeitos do MOS sobre o odor das fezes de gatos.

### **2.8.6 Outras atuações**

Um dos grandes benefícios atribuídos à utilização do mananoligossacarídeo se refere à sua atividade imunoduladora. Os mecanismos de seleção bacteriana, aliados à neutralização de micotoxinas no trato gastrintestinal, estimulariam o sistema imune, com aumento de imunoglobulinas (IgG, IgA) e de atividade neutrofílica (Griehop, 2003). Em pesquisa realizada por Swanson et al. (2002) em cães, a adição de MOS a dieta aumentou a concentração de linfócitos, em porcentagem (15,55 x 20,40), mas não alterou as concentrações séricas de IgG e de IgA. Quanto às concentrações ileais e fecais de IgA, somente a associação de MOS com FOS foi capaz de produzir aumento na concentração dessa imunoglobulina. Neste caso, a adição isolada de frutoligossacarídeo ou mananoligossacarídeo não foi eficaz na estimulação da resposta imune.

### **2.8.7 Extrato seco de parede de levedura e palatabilidade**

A palatabilidade do alimento é definida por uma variedade de fatores que incluem o aroma, o paladar, a textura e a consistência. Fatores externos, como a temperatura do alimento, também influenciam o consumo; alimentos palatáveis podem ser facilmente recusados por estarem na temperatura inadequada. Muitos gatos domésticos são sensíveis a variações que ocorrem na composição dos

alimentos e parece que muitos dos alimentos aceitos por gatos adultos já estiveram presentes nas primeiras fases de suas vidas, especialmente após o desmame. No entanto, é importante considerar que sempre há a variação individual e que um mesmo alimento poderá ser aceito ou recusado por um animal da mesma espécie. Os nervos faciais dos carnívoros são extremamente sensíveis a aminoácidos e menos responsivos a mono e a dissacarídeos. Nenhum sistema fisiológico relacionado à percepção do açúcar foi identificado em felinos domésticos. Eles podem aceitar dietas contendo glicose, mas dietas similares contendo galactose, sucrose e lactose levam a uma redução na ingestão, possivelmente devido a uma aversão aprendida (Bradshaw et al., 1996).

Swanson et al. (2002) não encontraram diferenças no consumo de alimentos, quando 0,3% de MOS foi oferecido a cães adultos (374g ingeridos pelo grupo controle x 377g para os animais suplementados).

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos testando os efeitos do mananoligossacarídeo e do extrato seco de parede de levedura sobre o consumo de alimentos em felinos.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Experimento 1

#### 3.1.1 Local, instalações e delineamento experimental

O presente ensaio foi realizado no Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia (CENAC) do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Lavras, região sul do estado de Minas Gerais, durante o mês de novembro de 2007.

Foram utilizados 20 gatos adultos, sem raça definida, machos e fêmeas, com peso médio de  $3,71 \pm 0,84$  kg, escore corporal 3 (na escala de 1 a 5) e idade média de 3 anos, alojados na sala de metabolismo do CENAC e mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o período experimental. As gaiolas metabólicas mediam 50x 70x 60 cm (largura x profundidade x altura), sendo constituídas de arame galvanizado e chapas metálicas nas laterais. Os bebedouros eram individuais e do tipo chupeta (que possibilitavam a avaliação do consumo individual de água) e o alimento foi fornecido em potes plásticos. Os animais selecionados, pertencentes à população permanente do gatil, passaram por avaliação médico-veterinária antes e durante a realização do ensaio.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições, num total de 20 unidades experimentais. A duração total do ensaio foi de 33 dias, sendo 23 destinados à adaptação e os dez últimos, à coleta de dados. Os tratamentos fornecidos a cada um dos grupos foram:

\* Tratamento 1 (controle): dieta comercial úmida padrão da marca Top Cat, sabor carne, produzida pela Mogiana Alimentos (Campinas, São Paulo) pertencente ao lote 86.A2.B5 com data de validade até 05/12/2009;

\* Tratamento 2: dieta comercial úmida + inclusão de 0,2% de extrato seco de parede de levedura<sup>1</sup> na matéria seca;

\* Tratamento 3: dieta comercial úmida + inclusão de 0,4% de extrato seco de parede de levedura na matéria seca;

\* Tratamento 4: dieta comercial úmida + inclusão de 0,6% de extrato seco de parede de levedura na matéria seca.

As quantidades de alimento oferecidas foram baseadas nas necessidades energéticas estimadas pela equação  $100 \text{ kcal} \times \text{PV}^{0,67}$  (National Research Council, 2006). A estimativa da energia do alimento foi realizada segundo a equação do National Research Council (2006). O EPL foi misturado individualmente em cada um dos potes e a água foi fornecida à vontade.

A composição básica e os níveis de garantia do alimento comercial úmido estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 Composição química analisada (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica\* do alimento úmido

Níveis nutricionais	% matéria natural	% matéria seca
Umidade	78,00	
Proteína bruta	9,85	44,77
Extrato etéreo	5,09	23,13
Fibra bruta	0,17	0,77
Matéria mineral	2,50	11,36
Extrativo não nitrogenado <sup>1</sup>	4,39	19,97

\* Composição básica: água, carne de frango, miúdos de bovinos, miúdos de aves, miúdos de suínos, cloreto de sódio (sal comum), carragena, taurina, premix vitaminico mineral. Enriquecimento de vitaminas e minerais: vitamina A (3000 UI/kg), vitamina B<sub>1</sub> (0,93 mg), vitamina B<sub>12</sub> (3,90 mcg), vitamina B<sub>2</sub> (1 mg), vitamina B<sub>6</sub> (0,6 mg), vitamina D<sub>3</sub> (300 UI/kg)<sup>1</sup>. Vitamina E (23 mg), vitamina K (0,16 mg), ácido fólico (0,12 mg), biotina (0,02 mg), vitamina B<sub>5</sub> (0,90 mg), cobre (0,44 mg), colina (187 mg), ferro (3,56 mg), iodo (0,04 mg), manganês (0,89 mg), niacina (9,30 mg), selênio (0,01 mg), zinco (8,83 mg). <sup>1</sup>- Obtido pela fórmula= 100- (PB+EE+FB+MM)

<sup>1</sup> BIO-MOS® - Extrato seco de parede de levedura da Alltech do Brasil.

### **3.1.2 Coleta de amostras**

Após pesagem, durante cinco dias, as sobras diárias de alimento foram armazenadas em sacos plásticos e congeladas, a -20°C, para análises de matéria seca. Tal procedimento, padrão para ensaios de digestibilidade realizados com alimentos úmidos, visa evitar erros na mensuração do consumo por perdas de água, durante a exposição da dieta ao ambiente.

Amostras das dietas úmidas fornecidas correspondentes a cada um dos quatro tratamentos foram submetidas à pré-secagem em estufa de 65°C, durante 72 horas, pesadas, moídas em moinho analítico providos de peneira de 1 mm e armazenadas, para análises bromatológicas posteriores. Sobras de dieta foram individualmente submetidas a análises de matéria seca.

Quanto às fezes, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas compondo uma amostra por animal, colocadas em pratos de alumínio e, em seguida, em estufa de ventilação forçada, a 65°C, por um período de 72 horas. Depois de retiradas da estufa, e atingindo o equilíbrio com a temperatura ambiente, as amostras foram pesadas, moídas em moinho analítico com malha de 1mm e acondicionadas em frascos, para a realização das análises químicas.

No 25º dia do período experimental, alíquotas de fezes frescas (coletadas até 15 minutos após a defecação) foram reservadas para mensuração de pH e para a realização das análises microbiológicas.

#### **3.1.2.1 Exames radiográficos e ultrassonográficos**

No 30º dia do período experimental, os animais foram submetidos aos exames radiográficos e ultrassonográficos executados pelo Serviço de Diagnóstico por Imagem do Setor de Clínica de Pequenos Animais, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), UFLA.

Para o exame radiográfico, foram utilizados o Aparelho Meditronix BR-200 e filmes Kodak® tamanho 24x30cm, aplicando-se a técnica de 50kV com 0,15mAs. Os animais foram radiografados na projeção laterolateral direita, sendo as radiografias reveladas, fixadas e interpretadas pelo próprio Serviço de Diagnóstico por Imagem.

O exame ultrassonográfico foi realizado com o equipamento Toshiba SSH-140A, com transdutores de 5MHz, após os gatos terem sido submetidos à ampla tricotomia do abdômen. Os animais foram então contidos em decúbito dorsal, sendo aplicado gel acoplador específico, segundo a metodologia descrita por Biller et al. (1994).

### **3.1.2.2 Colonoscopia e biópsias intestinais**

A partir do 30º dia, após a realização dos exames radiográficos e ultrassonográficos, os gatos começaram a ser preparados para o exame de colonoscopia, em que foram feitas as biópsias para a obtenção de amostras de tecido do cólon.

Para isso, os animais receberam as suas dietas diluídas (duas vezes o peso de água em relação ao peso do alimento) durante dois dias consecutivos, tendo sido submetidos a jejum alimentar, mas não hídrico, um dia antes da realização do exame. Tais procedimentos tiveram como objetivo a eliminação de fezes do intestino, já que a presença de bolo fecal inviabilizaria a visualização da mucosa e a coleta das amostras.

Os gatos foram anestesiados pelos médicos veterinários residentes do serviço de cirurgia do Hospital Veterinário da UFLA, utilizando-se a associação cloridrato de cetamina e midazolam. Os anestesistas acompanharam os animais durante todo o procedimento. A colonoscopia foi realizada, no bloco cirúrgico do Hospital Veterinário, por médica veterinária autônoma e responsável pelo setor de Diagnóstico por Imagem do Instituto Veterinário de Imagem (IVI-SP),

com o auxílio de um gastroscópio Olympus, modelo XQ10, com 9,8mm de diâmetro, canal de trabalho de 1,8 mm e comprimento de 120cm.

Foi utilizado um adaptador Olympus para microcâmera Gradiente, ligada a monitor com videocassete (VHS) para a gravação dos exames. A técnica consistiu na introdução do endoscópio no reto do animal e, por meio da insuflação cautelosa das porções intestinais, respeitando-se os movimentos peristálticos, avaliou-se a mucosa quanto à coloração, ao aspecto, a existência de lesões e alterações morfológicas.

O exame iniciou-se no reto, evoluindo até a porção da válvula íleo-cólica, e retorno do aparelho para a reavaliação da mucosa e a aspiração de ar, com a finalidade de diminuir a dilatação das alças intestinais.

Posteriormente, a partir da utilização de pinças especiais que passam por dentro do endoscópio, realizou-se a coleta de cinco fragmentos da porção mais cranial da mucosa do cólon dos gatos (um total de aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>). As amostras foram imediatamente fixadas em dois frascos diferentes contendo solução de Karnovsky modificada segundo Alves (2004) (composta por glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 e cloreto de cálcio 0,001M). Um dos frascos continha um fragmento de cerca de 1 cm<sup>2</sup> e foi imediatamente enviado ao Laboratório de Histopatologia do DMV da UFLA para a confecção de lâminas histológicas. O outro, com uma amostra de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, foi encaminhado para o Departamento de Fitopatologia para a montagem de stubs.

Após a realização do procedimento, os animais foram acompanhados até a recuperação da anestesia para serem conduzidos novamente ao gatil experimental, onde foram medicados, por mais três dias consecutivos, com 0,05 mL/kg de sulfametoxazol +trimetropim da marca Trissulfim<sup>®</sup> (Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo) e de meloxicam 0,2% da marca Maxicam<sup>®</sup> (Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo), via subcutânea.

O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, da UFLA.

### **3.1.3 Metodologias para análises**

#### **3.1.3.1 Determinação do pH das fezes**

A mensuração do pH das fezes recém-coletadas foi realizada utilizando-se um potenciômetro digital da marca Digimed<sup>®</sup> após a introdução direta do eletrodo nas fezes. Foram realizadas três medidas para cada uma das amostras e o resultado médio foi utilizado, segundo metodologia realizada por Swanson et al. (2002).

#### **3.1.3.2 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas da água, dos alimentos e das fezes foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

A água foi avaliada, quanto à sua potabilidade, segundo a Resolução n<sup>o</sup> 518 de 2004 (Brasil, 2004). Foram coletados cerca de 200mL da água de dessedentação dos animais para a realização das análises de coliformes totais e termotolerantes. A técnica utilizada foi a do número mais provável (NMP), segundo Silva et al. (2001). Para o alimento, também foi realizada a técnica NMP.

Para as fezes, foram realizadas as contagens totais de bactérias do ácido láctico e de clostrídio sulfito redutor. Para tanto, um grama de cada uma das amostras frescas de fezes foi assepticamente pesado e diluído em tubo de ensaio previamente esterelizado contendo 9mL de água peptonada 0,1%. Diluições seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-11}$ ) a partir desse tubo e inoculação das alíquotas apropriadas em placa de Petri (em duplicata) seguiram-se a esse procedimento.

Para as bactérias do ácido lático, utilizou-se um meio de cultura comercial ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), marca Biolife<sup>®</sup>. A técnica utilizada foi a de profundidade com sobrecamada. Inicialmente, foi inoculado 1mL das diluições apropriadas, em placas contendo cerca de 15mL do meio de cultura. Após solidificação da primeira camada, foi vertida mais uma sobre ela, para posterior incubação, a 28°C, por 48 horas. Após esse período, procedeu-se à contagem de todas as colônias, sendo os resultados expressos em log de UFC/g de fezes na matéria original (Silva et al., 2001).

Para a análise de clostrídios sulfito redutores, utilizou-se um meio de cultura comercial sulfito polimixina sulfadiazina ágar (SPS), da marca Biolife<sup>®</sup>. Como esses microrganismos são formadores de esporos e estes podem estar presentes nas fezes, uma ativação foi necessária para evitar subestimação dos resultados. Assim, a amostra foi aquecida, a 80°C, por 10 minutos, para promover a passagem de esporos à forma vegetativa. Posteriormente, alíquotas de 1mL das diluições apropriadas foram transferidas para placas contendo, aproximadamente, 15mL do meio de cultura (técnica de profundidade). Após plaqueamento e solidificação do meio, as placas foram transferidas para jarras de anaerobiose contendo um gerador para cada 2,5L. A temperatura utilizada na incubação foi a de 37°C. Procedeu-se a contagem de colônias negras e os resultados foram expressos em log de UFC/g de fezes na matéria original (Silva et al., 2001).

### **3.1.3.3 Análises bromatológicas e cálculos da energia metabolizável e dos coeficientes de digestibilidade**

As amostras de fezes e dietas foram analisadas, quanto à matéria-seca, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral, no Laboratório de Bromatologia, no Departamento de Zootecnia (ZAZ) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, seguindo a

metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995). A determinação da energia bruta foi efetuada em bomba calorimétrica adiabática PARR, segundo procedimento descrito por Silva & Queiroz (2002), no Laboratório de Pesquisa Animal, no DZO/UFLA.

A partir das concentrações de nutrientes nas dietas e nas fezes, foi calculada a matéria orgânica de ambos, os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e a energia metabolizável, para cada um dos tratamentos. Os cálculos para a obtenção da matéria orgânica e dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, dos nutrientes, da energia digestível obtida e da energia metabolizável corrigida estão demonstrados a seguir:

*Coefficiente de digestibilidade da matéria seca*

$$CDAMS = [(a-b)/a] \times 100$$

em que:

a = consumo de alimento na matéria seca

b = fezes excretadas na matéria seca

*Coefficiente de digestibilidade dos nutrientes:*

$$CDAnutriente = \{[(a \times b) - (c \times d)] / (a \times b)\} \times 100$$

em que:

a = consumo de alimento na matéria seca

b = % do nutriente no alimento

c = quantidade excretada de fezes na matéria seca

d = % do nutriente nas fezes

### *Energia digestível*

$$\text{Energia digestível} = [(a \times b) - (c \times d)] / a$$

em que:

a = consumo de alimento

b = energia bruta do alimento por grama

c = quantidade excretada de fezes

d = energia bruta das fezes por grama

#### **3.1.3.4 Análises histológicas**

No Laboratório de Histopatologia, DMV/UFLA, as amostras de cólon dos gatos foram preparadas para a confecção das lâminas histológicas. Para tanto, foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, clarificadas em xilol, impregnadas em parafina aquecida e fundida e cortadas em micrótomo.

Posteriormente, os cortes foram distendidos em água quente e transferidos para lâminas previamente revestidas por albumina. Os tecidos foram, então, corados pelo hematoxilina e eosina (HE), corante composto por hematoxilina, hemateína e mordente metálico, conforme metodologia descrita por Fieri et al. (1997). Os cortes eram transversais e correspondiam à porção mais superior da parede intestinal dos gatos.

As lâminas foram, então, avaliadas em um microscópio de luz da marca Ken-a-vision T-110, com câmara acoplada a um sistema multimídia Q capture, em um computador, utilizando-se uma objetiva de 40 x (aumento de 400 x).

Foram selecionadas, de forma aleatória, 20 criptas intestinais por animal, sendo contadas todas as células epiteliais (colonócitos) e caliciformes presentes.

O número total de cada um desses tipos celulares, a relação entre elas e suas características morfológicas foram avaliados.

### **3.1.3.5 Preparação de stubs para microscopia eletrônica**

As amostras pré-fixadas com aldeído foram lavadas, por três vezes, em tampão cacodilato, por cerca de 10 minutos (para a retirada dos resíduos do glutaraldeído), pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 3 horas e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%, uma vez cada e 100%, por três vezes). Em seguida, os materiais foram levados ao ponto crítico para completar a secagem, montados em stubs e cobertos com ouro, segundo metodologia descrita por Alves (2004).

As leituras foram feitas no microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA. As imagens tiveram apenas caráter ilustrativo.

### **3.1.3.6 Análises radiográficas e ultrassonográficas**

Nas radiografias, avaliaram-se a área de produção de gás e o espessamento das alças intestinais, utilizando-se, para tanto, medidas qualitativas (sistema de score) e quantitativas (mensuração das áreas de gás).

Para a análise qualitativa, as radiografias foram classificadas em um sistema de pontuação de 1 a 3, em que 1 correspondia à pequena; 2, moderada e 3, grande quantidade de gás nas alças intestinais, conforme descrito por Feliciano (2008).

A metodologia para a análise quantitativa dos gases foi modificada a partir do que foi descrito por Feliciano (2008) e Maia (2008). As áreas de gás das alças intestinais presentes nas imagens radiográficas (áreas

radiotransparentes) foram mensuradas por meio do programa computacional *Image Processing and Analyses in Java* (Image J<sup>®</sup>).

Para isso, todas as radiografias, previamente identificadas por uma marcação de 1cm, foram fotografadas com câmera digital (Figura 8).

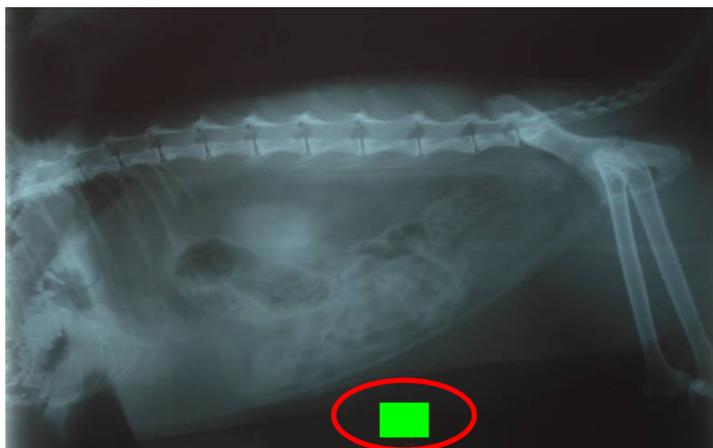


FIGURA 8 Imagem fotográfica da radiografia do animal 2, com marcação referente a distância de 1cm.

Posteriormente, as imagens foram trabalhadas para serem analisadas no programa Image J<sup>®</sup>. O trabalho das imagens foi realizado no programa Paint<sup>®</sup>, em que, após o contorno das áreas, foi feito o recorte dessas regiões com posterior colagem em uma área branca previamente desenhada do lado direito da imagem, conforme demonstrado nas Figuras 9 e 10.

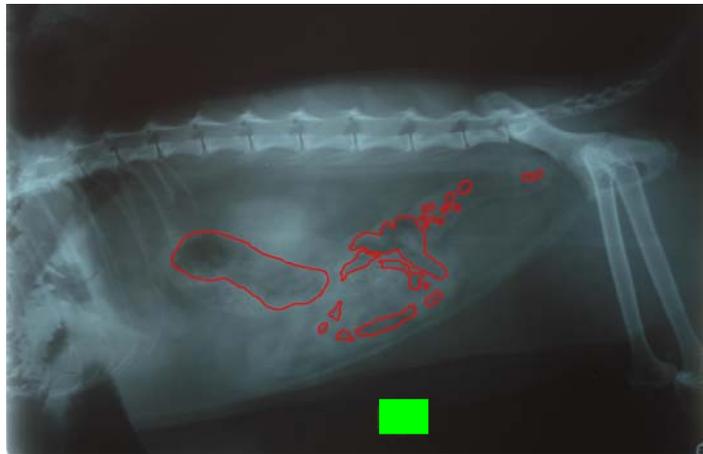


FIGURA 9 Imagem fotográfica da radiografia do animal 2, com a marcação das áreas de gás (áreas radiotransparentes) realizadas no programa Paint ®.

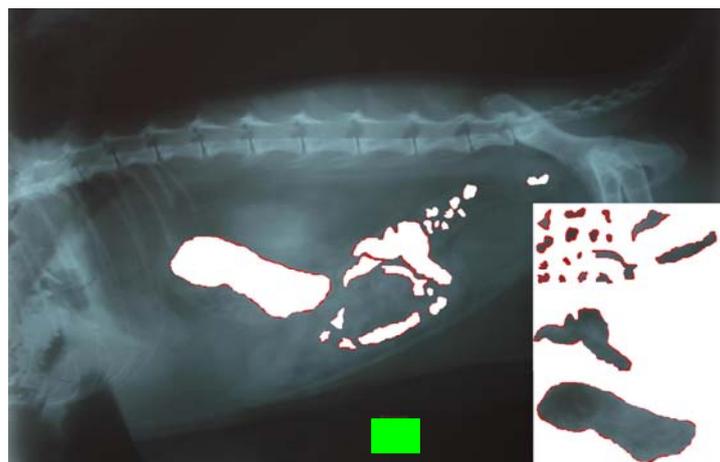


FIGURA 10 Imagem fotográfica da radiografia do animal 2, após o recorte das áreas de gás.

Após o trabalho das fotografias, elas foram abertas no software Image J<sup>®</sup> para o início das análises de mensuração das áreas de gás. Inicialmente, na barra de ferramentas do *menu* do programa, selecionou-se a opção <Linha Contínua>,

que possibilita o traçado de uma linha reta sobre as medidas coladas previamente nas radiografias.

Então, no *menu*, acessou-se a opção <Analyse> seguida de <Set Scale>, abrindo-se uma janela indicando a distância em *pixels* da marcação em amarelo, realizada sobre a medida anteriormente fixada e pedindo a inserção da distância conhecida, no caso específico, 1cm.

Posteriormente, fez-se o ajuste das imagens para 8 bits (escala de cinza) para que estas adquirissem o formato preto e branco. Em seguida, ainda no *folder* <Image> da barra de ferramentas, acessou-se a opção <Adjust> e, logo depois, a <Threshold> (ctrl+shift+T), escolhendo-se a forma <Black and White>. Assim, obtiveram-se imagens negativas, em que todas as áreas de gás presentes assumiram a cor branca, destacando-se sobre o fundo preto.

Em seguida, utilizou-se a ferramenta varinha mágica <Wand Tool>, clicando-se sobre cada uma das áreas de gás. Estas receberam uma marcação amarela que possibilitou a mensuração da área assinalada (Figura 11).

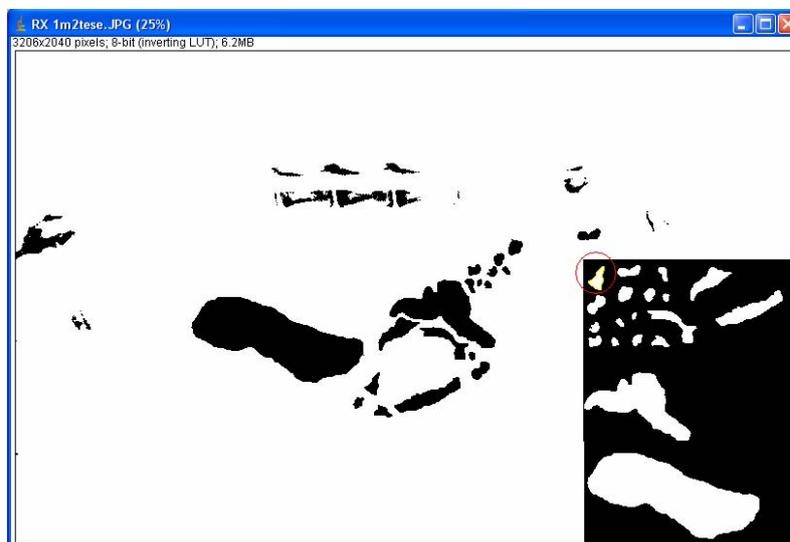


FIGURA 11 Imagem da radiografia após a seleção de uma das áreas de gás coladas à direita da figura com a ferramenta Wand tool do Image J ®.

Por fim, acessou-se no *menu* a opção <Analyse>, seguida de <Measure>, para a avaliação de cada área individualmente. O resultado da mensuração foi descrito na janela <Results> do programa, somado para a determinação da área total de gás presente nas alças intestinais em cada uma das radiografias.

Nas imagens ultrassonográficas avaliou-se a espessura da parede intestinal. Foram realizadas três mensurações e a média delas utilizada para as análises estatísticas posteriores (Figura 12).



FIGURA 12 Imagem ultrassonográfica evidenciando as camadas da parede intestinal do cólon do animal (círculo) e as mensurações da espessura desta em milímetros.

### 3.1.4 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute, 2004), sendo previamente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC Univariate) e as variâncias comparadas pelo teste de Hartley. As variáveis que não atenderam às premissas foram transformadas (conforme indicado nos Anexos) e, quando a transformação foi ineficaz, foram avaliadas por estatística não paramétrica (teste de Kruskal Wallis), pelo PROC NPARIWAY do SAS. O peso foi testado como covariável no modelo e não foi confirmado como fonte de variação. Os dados foram então submetidos à regressão polinomial simples, segundo o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + E_{ijk}$$

em que:

$Y_{ijk}$  = variável Y

$\mu$ = média paramétrica

F= efeito da inclusão de MOS (F= 1,2,3,4)

Eijk = erro do modelo

Tais análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Para todas as análises, considerou-se um nível de significância de 5%.

## **3.2 Experimento 2**

### **3.2.1 Procedimento experimental**

O segundo experimento consistiu em um ensaio de palatabilidade que também foi realizado na sala de metabolismo do CENAC-UFLA, durante o mês de maio de 2008. Para este experimento, com duração total de dez dias (sendo quatro de adaptação e seis de coleta), foram utilizados vinte gatos adultos, dez machos e dez fêmeas, sem raça definida, com peso médio de  $3,65 \pm 0,79$  kg, em um total de 120 observações. Os animais que possuíam 3 anos de idade e escore corporal 3 (escala de 1 a 5) foram alojados em gaiolas metabólicas, durante todo o período experimental.

Na fase de adaptação, os animais receberam um alimento comercial úmido padrão, diferente do que foi utilizado na fase de coleta, com a finalidade de evitar a ocorrência de neofobia (alimento em lata Sabor e Vida<sup>®</sup>, sabor Atum e Sardinha, produzido pela Mogiana Alimentos, em Campinas, SP). Nesta etapa, foram calculadas as necessidades energéticas dos animais com o acréscimo de 30% para fornecimento do alimento no primeiro dia. Os ajustes foram realizados dia a dia para cada animal, de acordo com as sobras obtidas, de forma que se garantissem, ao menos, 15% de sobras para o período da coleta. Os animais recebiam o mesmo alimento em duas vasilhas, para adaptá-los à metodologia que seria empregada para o teste de palatabilidade nos dias subsequentes.

A composição, bem como os níveis de garantia do alimento utilizado na fase de adaptação, está apresentada na Tabela 6. Na fase de coleta, os animais receberam duas vasilhas, cada uma contendo a quantidade de alimento ajustada no período de adaptação. Em uma delas, havia apenas alimento comercial úmido (ração Top Cat, sabor carne, produzida pela Mogiana Alimentos em Campinas, SP, pertencente ao lote 86.A2.B5, com data de validade até 05/12/2009, com composição apresentada na Tabela 7) e, na outra, o mesmo alimento com 0,4% de extrato de parede seca de levedura na matéria seca<sup>2</sup>. O aditivo foi incorporado à dieta com o auxílio de uma colher e o pote que continha a dieta controle (sem o extrato) foi misturado para evitar efeitos de diferenças na consistência sobre o consumo. Os gatos foram alimentados, todos os dias, às 8 horas da manhã e as vasilhas ficaram disponíveis durante 24 horas. Para evitar efeitos de lateralidade, os potes plásticos com os alimentos eram alternados no posicionamento, ora colocados à direita do animal, ora à esquerda.

---

<sup>2</sup> BIO-MOS- extrato seco de parede de levedura da Alltech do Brasil

TABELA 6 Níveis de garantia (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica\* do alimento úmido na fase de adaptação

<b>Níveis nutricionais</b>	<b>% matéria natural</b>	<b>% matéria seca</b>
Umidade (máx)	80	
Proteína bruta (mín)	8	40
Extrato etéreo (mín)	3	15
Fibra bruta (máx)	1,5	7,5
Matéria mineral (máx)	2,5	12,5
Cálcio (máx)	0,4	2
Fósforo (mín)	0,2	1
Taurina (mín)	0,05	0,4

\* Composição básica: água, atum, sardinha, carne de frango, miúdos de bovinos, miúdos de aves, miúdos de suínos, gordura animal estabilizada, óleo de peixe refinado, carragena, premix vitamínico e mineral, tripolifosfato de sódio, taurina.

TABELA 7 Níveis de garantia (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica\* do alimento úmido na fase de coleta

<b>Níveis nutricionais</b>	<b>% matéria natural</b>	<b>% matéria seca</b>
Umidade (máx)	80	
Proteína bruta (mín)	8	40
Extrato etéreo (mín)	3	15
Fibra bruta (máx)	1,5	7,5
Matéria mineral (máx)	2,5	12,5
Cálcio (máx)	0,4	2
Fósforo (mín)	0,2	1
Taurina (mín)	0,05	0,4

\* Composição básica: água, carne de frango, miúdos de bovinos, miúdos de aves, miúdos de suínos, cloreto de sódio (sal comum), carragena, taurina, premix vitamínico mineral.

Na manhã do dia seguinte, todas as sobras de alimento foram pesadas e, por tratar-se de alimento úmido, foram armazenadas para posterior análise de

matéria seca, com a finalidade de evitar erros na mensuração do consumo por evaporação ou incorporação de água pela longa exposição ao ambiente.

Durante todo o período de teste, a água foi fornecida à vontade em bebedouros automáticos tipo chupeta, instalados nas gaiolas metabólicas.

A palatabilidade foi avaliada por meio do consumo e da razão de ingestão que é definida pela seguinte fórmula:

$$\text{Razão de ingestão (RI)} = \text{Ing AA} / (\text{Ing AA} + \text{Ing AB})$$

em que:

ing AA = ingestão do alimento A;

ing AB = ingestão do alimento B.

O protocolo experimental seguiu o modelo descrito anteriormente por Carciofi et al. (2006).

### **3.2.2 Análises estatísticas**

O peso foi anteriormente testado como covariável, não sendo identificado como fonte de variação. Os resultados foram, então, submetidos à análise estatística, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = u + F_i + D_j + (FD)_{ij} + E_{ijk}$$

no qual:

$Y_{ijk}$  = ingestão diária

U = média paramétrica

F = efeito do alimento i (1,2)

D = efeito do dia (1,2,3,4)

(FD) = interação entre o alimento i e o dia j

Eijk = erro do modelo.

Assim como o protocolo experimental, o tratamento estatístico seguiu o anteriormente proposto por Carciofi et al. (2006).

### **3.3 Experimento 3**

#### **3.3.1 Local, instalações e delineamento experimental**

O terceiro ensaio também foi realizado no Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia (CENAC) do Departamento de Zootecnia da UFLA, entre os meses de setembro e outubro de 2008.

Foram utilizados 20 gatos adultos, sem raça definida, machos e fêmeas, com três anos, peso médio de  $3,56\text{kg} \pm 0,78\text{kg}$  e escore de condição corporal 3 (escala de 1 a 5), alojados na sala de metabolismo do CENAC e mantidos em gaiolas metabólicas, durante todo o período experimental.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições, em um total de 20 unidades experimentais. O experimento foi composto por 21 dias de adaptação, seguidos por quatro de coleta de fezes frescas para análises de microbiologia (contagem total de enterobactérias, bactérias lácticas e clostridium sulfito redutor), ácidos graxos de cadeia curta, nitrogênio amoniacal e teste sensorial para avaliação do potencial de redução do odor de fezes. Os tratamentos fornecidos a cada um dos grupos foram:

\* Tratamento 1 (controle): dieta comercial seca padrão (alimento Max Cat tradição, produzido pela Total Alimentos, Três Corações, MG);

\* Tratamento 2: dieta comercial seca + inclusão de 0,2% de extrato seco de parede de levedura<sup>3</sup> na matéria seca;

\* Tratamento 3: dieta comercial seca + inclusão de 0,4% de extrato seco de parede de levedura na matéria seca;

\* Tratamento 4: dieta comercial seca + inclusão de 0,6% de extrato seco de parede de levedura na matéria seca.

As quantidades de alimento oferecidas basearam-se nas necessidades energéticas estimadas pela equação  $100 \text{ kcal} \times \text{PV}^{0,67}$  (National Research Council, 2006). Para facilitar a mistura do MOS no alimento comercial, uma quantidade padronizada de água (1,92 vez o peso da ração) foi acrescida e este foi processado em liquidificador. Posteriormente, o alimento, para cada animal, foi individualmente pesado e a concentração de EPL correspondente misturada para que pudesse ser fornecido.

A composição básica e os níveis de garantia do alimento comercial seco estão demonstrados na Tabela 8.

---

<sup>3</sup> BIO-MOS®- Extrato seco de parede de levedura da Alltech do Brasil

TABELA 8 Composição química analisada (% da matéria natural e da matéria seca) e composição básica\* do alimento seco

<b>Níveis nutricionais</b>	<b>% matéria natural</b>	<b>% matéria seca</b>
Umidade	7,17	
Proteína bruta	32,34	34,83
Matéria mineral	6,62	7,13

\*Composição básica: arroz quebrado, farinha de vísceras, farelo de glúten de milho-60, milho integral moído, farelo de soja, farinha de peixe, gordura de frango, carne de ovelha em pó, semente de linhaça, levedura seca, hidrolisado de frango e/ou subprodutos, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), cloreto de potássio, colina e premix vitamínico mineral. Enriquecimento por kg de produto: Vitamina A (15.000 U.I.), vitamina B12 (200 mcg), vitamina C (22mg), vitamina D (2.500 U.I.), vitamina E (450 U.I.), selênio (0,3 mg), ácido fólico (2 mg), ácido pantotênico (20 mg), colina (2.500 mg), cobre (20 mg), ferro (150 mg), iodo (1,5 mg), magnésio (0,9 g), manganês (20 mg), potássio (6.000 mg), sódio (3 g), vitamina B1 (15 mg), vitamina B2 (15 mg), vitamina B6 (2,10 mg), vitamina H (0,1 mg), vitamina K (0,8 mg), vitamina PP (80 mg), zinco (200 mg), taurina (1.000 mg).

### 3.3.2 Coleta de amostras

Após 21 dias de experimento, durante quatro dias consecutivos, foram coletadas fezes frescas para a realização das análises de microbiologia, ácidos graxos de cadeia curta, nitrogênio amoniacal e teste sensorial.

### 3.3.3 Análises microbiológicas

As análises da água e do alimento a partir da técnica do NMP, bem como as metodologias para contagem total de bactérias do ácido láctico e clostrídio sulfito redutor seguiram os procedimentos descritos no experimento 1.

Para a determinação de enterobactérias, inicialmente, 1 g da amostra foi diluído em água peptonada 0,1%. A seguir, foram realizadas as diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ), definidas a partir de testes pré-experimentais. Foi utilizado um meio comercial ágar eosina azul de metileno (EMB), utilizando-se a técnica de

plaqueamento por superfície. Para isso, inoculou-se 0,1 mL do conteúdo dos tubos contendo as diluições adequadas (em triplicata) sobre o ágar solidificado e, em seguida, realizou-se o espalhamento do inóculo, com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD, a 37°C, por 48 horas. Realizou-se a contagem de todas as colônias maiores que 1 mm, sendo os resultados expressos em log de microrganismos/g de fezes.

Em seguida, as colônias que cresceram nas placas foram isoladas para testes confirmativos para *E. coli*.

Para isso, de cada tubo de EC com produção de gás em 24 ou 48 horas, estriou-se uma alçada em placas de EMB, durante 24 horas, a 37°C. Duas colônias de cada uma das encontradas foram transferidas para PCA (ágar padrão para contagem) e os tubos incubados, a 37°C, por 24 horas. A partir das culturas em PCA, fez-se a coloração de gram e inoculou-se nos meios teste descritos a seguir, para a realização das provas bioquímicas de indol, VM (vermelho de metila), VP (Voges Proskauer) e citrato, na série denominada IMViC, conforme descrito abaixo:

a) teste de citrato: para esta prova, inoculou-se uma alçada com inóculo leve da cultura em ágar citrato de Simmons e incubou-se, a 37°C, por 96 horas. A passagem do meio de verde para azul foi indicativa de teste positivo. As ausências de crescimento sem alteração do meio indicaram teste negativo;

b) indol: no teste do indol, foi inoculada uma alçada leve do inóculo da cultura em caldo tripton 1% e incubado, a 37°C, por 24 horas. Adicionaram-se 5 gotas do reagente de Kovacs a cada uma e agitou-se levemente. Observou-se a formação de um anel vermelho violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo) ou a permanência do anel na cor amarela (teste negativo);

c) teste de VM-VP: inicialmente, inoculou-se uma alçada leve da cultura em caldo VM-VP e incubou-se, a 37°C, por 48 horas. Posteriormente, para o teste de VP (Voges Proskauer), transferiu-se, asépticamente, 1mL da cultura

para tubo de ensaio e adicionaram-se 0,6mL de alfa naftol 5%, 0,2% da solução de KOH 40% e, por último, uma pitada leve de cristais de creatina, para acelerar a reação. Entre a adição de cada um dos reagentes, procedeu-se a agitação do tubo de ensaio. Deixou-se descansando e observou-se, periodicamente, a cada uma hora, o desenvolvimento de uma coloração vermelha ou rósea no meio de cultura (teste positivo). A coloração amarela ou ligeiramente esverdeada indicou teste negativo. Reincubou-se a cultura remanescente no caldo VM-VP por 48 horas adicionais e realizou-se o teste de VM após 96 horas. Para isso, adicionaram-se 10 gotas de vermelho de metila, observando-se se o meio adquiriu coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo).

Foram consideradas positivas para *E. Coli*, segundo o teste de IMViC, as colônias que se apresentaram como bastonetes gram-negativos, indol positivo ou negativo, VM positivo, VP negativo e citrato negativo .

### **3.3.4 Determinação do nitrogênio amoniacal**

As amostras coletadas até 15 minutos após a defecação foram conservadas em ácido clorídrico 2 N (10 mL a cada 4 gramas) e congeladas até o momento das análises. A determinação do N-amoniacal foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), segundo a metodologia da AOAC (1995).

### **3.3.5 Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)**

Para as análises de AGCC, as fezes também foram coletadas até 15 minutos após a defecação, acidificadas com ácido clorídrico a 2 N (4 gramas para cada 10 mL) e congeladas até o momento das análises, que foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia da

Escola de Veterinária da UFMG, segundo metodologia adaptada de Erwin et al. (1961).

O cálculo para a concentração de cada um dos ácidos presentes na amostra está apresentado abaixo:

$$\% \text{ do AGCC na MS fezes} = (\text{dens.} \times \text{conc}) \times (\text{pureza} \times \text{vol. padrao inj}) / 100 \times (\text{área amostra} / \text{área padrão}) \times (\text{umidade} / \text{vol. amostra injetada}) \times (100 / \text{MSD})$$

em que:

conc. = concentração do padrão injetado

dens. = densidade do ácido

MS fezes = matéria seca das fezes

MSD = matéria seca definitiva

$$\text{AGCC total} = \text{conc de acético} + \text{conc. de propiônico} + \text{conc. de butírico}$$

em que:

conc. = concentração do respectivo ácido, em %, na matéria seca das fezes

Para facilitar a comparação com outros trabalhos, a concentração, em %, foi convertida para concentração em  $\mu\text{mol/g}$  de fezes da seguinte maneira:

Para o acético:

$$1 \text{ g} = 1.000.000 \mu\text{g}$$

$$\text{Concentração nas fezes} = 2,58\%$$

2,58g---- 100 g

x ----- 1 g = 0,0258 g de ácido acético por grama de matéria seca de fezes

0,0258g = 25800 mcg, então, há 25.800 µg de ácido acético/g de fezes

Posteriormente, dividiu-se a concentração obtida pelo peso molecular do ácido que, no caso do acético, é de 60,05 g/mol.

$25800/60,05 = 429,64$  µmol de ácido acético por grama de matéria seca de fezes.

Para os ácidos propiônico e butírico, o mesmo procedimento foi utilizado dividindo-se a concentração, em microgramas, pelos pesos moleculares desses ácidos, que são 74,08g e 88,12g, respectivamente.

### **3.3.3.5 Teste sensorial**

Cerca de 25 g de fezes, correspondentes a cada um dos quatro tratamentos, foram coletadas logo após a defecação e compuseram amostras. O tratamento controle recebeu a designação de padrão (P) e cada uma das outras amostras (1,2 e 3) foi comparada em relação a ela, no que diz respeito ao odor: se melhor, igual ou pior, de acordo com um sistema de escore que variou de 0 a 4, em que 0 significava amostra com odor extremamente pior que o do padrão; 1, pior que o padrão; 2, igual ao padrão; 3, melhor que o padrão e 4, muito melhor que o padrão, como demonstrado no questionário apresentado na Figura 13.

Para atender ao número amostral suficiente para posteriores análises estatísticas, 51 pessoas participaram individualmente do teste, avaliando sensorialmente todas as amostras em contraste com o padrão. Entre cada uma das avaliações, recebiam um copo de pó de café, com o objetivo de eliminar os resíduos de odor referentes ao da amostra anterior, que poderiam comprometer a

avaliação sensorial. O teste foi realizado no período da manhã (das 8 às 11 horas) e teve duração de três horas.

A metodologia aplicada neste teste sensorial foi adaptada da que foi proposto por Maia (2008).

### **3.3.6 Análises estatísticas**

As análises estatísticas seguiram os procedimentos e o modelo adotado no experimento 1.

NOME: _____	
DATA: __/__/____	
<b>ANALISE SENSORIAL DO ODOR DE FEZES DE GATOS</b>	
<p>Você recebeu uma amostra padrão (P) e outras três amostras numeradas de 1 a 3. Compare cada amostra com o padrão (se é <b>MELHOR, PIOR</b>, ou <b>IGUAL</b> ao <b>PADRÃO</b>) em relação ao <b>ODOR APENAS</b>, avaliando o grau de diferença em relação à escala abaixo.</p>	
<p><b>0</b> – Extremamente inferior ao padrão.</p> <p><b>1</b> – Inferior ao padrão.</p> <p><b>2</b> – Igual ao padrão.</p> <p><b>3</b> - Melhor que o padrão</p> <p><b>4</b>- Muito melhor que o padrão</p>	
<p>Numero da amostra</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>	<p>Valor dado</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>

FIGURA 13 Questionário submetido aos voluntários para a realização do teste sensorial com as amostras de fezes de gatos

## **3.4 Experimento 4**

### **3.4.1 Protocolo experimental**

O protocolo experimental desse ensaio (número de animais, peso médio, dietas, etc.) é semelhante ao descrito para o experimento 3.

### **3.4.2 Coleta de amostras**

#### **3.4.2.1 Dietas e fezes**

Após o período de adaptação, durante cinco dias, foram realizadas as coletas de amostras de dieta, assim como das fezes, para a realização de análises de composição química.

Cerca de 500 gramas de alimento seco, correspondente a cada um dos tratamentos, foram armazenadas para esta finalidade. A coleta total de fezes foi realizada uma vez ao dia, no período da manhã. Elas foram armazenadas em sacos plásticos, tendo todo o material coletado sido pesado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , diariamente.

Após pesagem, durante esses cinco dias, as sobras diárias de alimento foram armazenadas em sacos plásticos e congeladas, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para análises de matéria seca. Tal procedimento, padrão para ensaios de digestibilidade realizados com alimentos úmidos, visa evitar erros na mensuração do consumo por perdas de água, durante a exposição da dieta ao ambiente.

Amostras das dietas correspondentes a cada um dos quatro tratamentos foram submetidas à pré-secagem em estufa, a  $65^{\circ}\text{C}$ , durante 72 horas, pesadas, moídas em moinho analítico providos de peneira de 1 mm e armazenadas para análises bromatológicas posteriores. Após pesagem, as sobras diárias foram armazenadas em sacos plásticos e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores de matéria seca. Adotou-se esse procedimento devido à adição de água à ração.

A coleta total de fezes foi realizada uma vez ao dia, no período da manhã. As fezes foram armazenadas em sacos plásticos, sendo todo o material coletado pesado e congelado, a -20°C. Posteriormente, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, colocadas em pratos de alumínio e, em seguida, em estufa de ventilação forçada, a 65°C, por um período de 72 horas. Depois de retiradas da estufa e atingindo o equilíbrio com a temperatura ambiente, as amostras foram pesadas, moídas em moinho analítico com malha de 1mm e acondicionadas em frascos, para a realização das análises químicas.

### **3.4.3 Metodologias para análises**

#### **3.4.3.1 Análises bromatológicas e cálculos da energia digestível e dos coeficientes de digestibilidade**

As amostras de fezes e as dietas foram analisadas quanto à matéria-seca, proteína bruta, matéria mineral e energia bruta. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA, segundo procedimento descrito por Silva & Queiroz (2002).

A partir das concentrações de nutrientes nas dietas e fezes, foi calculada a matéria orgânica de ambos os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e a energia digestível para cada um dos tratamentos. Os cálculos foram realizados de forma semelhante ao citado no experimento 1.

#### **3.4.3.2 Análises estatísticas**

As análises estatísticas seguiram os procedimentos e o modelo adotado no experimento 1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento 1

#### 4.1.1 pH e grupos bacterianos fecais

A análise de coliformes totais e termotolerantes da água e das dietas experimentais não acusou a presença de microrganismos contaminantes.

Os resultados para o pH fecal, número de bactérias láticas e concentração de clostrídio sulfito redutor e relação bactérias láticas/clostrídio sulfito redutor nas fezes dos gatos estão demonstrados na Tabela 9.

TABELA 9 Valores de pH, de bactérias ácido-láticas (log UFC/g de matéria original) e de clostrídio sulfito redutor (log UFC/g de matéria original) das fezes dos gatos.

Variável	Tratamentos (% EPL)					p*		
	0	0,2	0,4	0,6	CV	L	Q	D
pH	6,46	6,34	6,45	6,40	2,12	NS	NS	NS
BAL (log UFC/g MO)	11,83	11,75	11,81	11,69	4,38	NS	NS	NS
CSR (log UFC/g MO)	6,21	6,38	5,99	6,03	6,56	NS	NS	NS
REL	1,91	1,85	1,97	1,94	7,75	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio; MO: matéria original; BAL: bactéria ácido-lática; CSR: clostrídio sulfito redutor; REL: relação bactérias láticas/clostrídio sulfito redutor

No presente estudo, não houve diferenças significativas da inclusão de extrato seco de parede de levedura na dieta sobre os valores de pH, de bactérias ácido-láticas e de clostrídio sulfito redutor nas fezes dos gatos. A relação entre bactérias láticas e clostrídio sulfito redutor também não foi afetada pela inclusão de EPL na dieta.

Estes resultados levam a sugerir que o mananoligossacarídeo do EPL não foi fermentado diretamente e de forma significativa pelas bactérias lácticas da microbiota intestinal, o que não gerou condições de abaixamento de pH que facilitariam o aumento no número desta população bacteriana em detrimento de espécies proteolíticas, como as bactérias do grupo clostridio sulfito redutor. Em estudos realizados com cães, como nos experimentos de Zentek et al. (2002) e Middelbos et al. (2007), houve uma diminuição significativa no pH fecal de animais alimentados com MOS e parede de levedura, respectivamente, mas é importante ressaltar que as concentrações utilizadas no primeiro experimento são muito maiores do que as empregadas como aditivo em dietas comerciais e que são recomendadas por fabricantes. Além disso, nos dois ensaios, a dieta fornecida aos animais foi seca, a qual sempre possui concentração menor de proteína bruta, se comparada com a ração úmida que os gatos deste ensaio receberam. O alimento úmido utilizado neste estudo tem cerca de 40% de proteína bruta na matéria seca e essa composição diferenciada da dieta pode alterar o metabolismo bacteriano e influenciar grandemente o estabelecimento da microbiota, conforme constatado por Zentek et al. (2004), ao estudarem o crescimento de *Clostridium perfringens* em cães e Backus et al. (2002), ao verificarem seus efeitos sobre a microbiota fecal de felinos.

Concentrações menores de carboidrato presente nos alimentos úmidos também podem interferir no padrão de fermentação. As bactérias lácticas utilizam carboidratos como substrato para o seu crescimento e os teores são reduzidos (cerca de 25% da matéria seca) nas dietas úmidas.

Como há evidências, pelos trabalhos de Hussein & Healy (2001), citados por Swanson & Fahey Junior (2001) e Vickers et al. (2001) de que o MOS seria apenas moderadamente fermentado pelas bactérias intestinais, essa composição assume importância ainda maior, já que o principal mecanismo de ação do mananoligossacarídeo seria a eliminação das bactérias fimbrias tipo 1 e estas,

em menor concentração, diminuiriam seu poder de competição pela adesão, facilitando o estabelecimento das bactérias lácticas. No entanto, se os substratos provenientes da dieta estão em menor concentração para utilização por estas bactérias, a colonização fica comprometida. Um dos principais microrganismos lácticos, o *Lactobacillus* sp., é fastidioso e a falta de substrato poderia influenciá-lo negativamente. No entanto, neste experimento, apesar da concentração menor de carboidratos disponíveis, foi possível observar um ótimo crescimento de bactérias lácticas em todos os tratamentos, inclusive o controle.

Vale ressaltar que, além da dieta, outros fatores, como a própria interação entre os microrganismos da microbiota, podem interferir no crescimento e estes podem ter estimulado o bom crescimento das bactérias lácticas. De qualquer forma, esse efeito não teve relação com a adição de extrato seco de parede de levedura à dieta.

#### 4.1.2 Digestibilidade de nutrientes, de energia e escore fecal

Os resultados para o consumo de nutrientes e energia estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 Consumo de nutrientes (g/dia) e de energia (kcal/dia)

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
CMS (g/dia)	52,05	53,86	54,33	42,18	23,24	NS	NS	NS
CPB (g/dia)	23,31	23,16	24,32	18,60	23,34	NS	NS	NS
CEE (g/dia)	12,04	12,43	11,94	9,62	23,14	NS	NS	NS
CMM (g/dia)	6,09	5,90	6,23	4,56	24,38	NS	NS	NS
CMO(g/dia)	45,96	47,95	48,10	37,62	23,12	NS	NS	NS
CEB (kcal/dia)	296,70	305,91	312,43	234,94	23,75	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio; CMS: consumo de matéria seca; consumo de proteína bruta; CEE: consumo de extrato etéreo; CMM: consumo de matéria mineral; CMO: consumo de matéria orgânica; CEB: consumo de energia bruta.

A média geral de consumo (50,41 g/dia) situou-se cerca de 20% abaixo da quantidade fornecida (que era de 63 g) e que foi calculada pela equação  $100 \times PV^{0,67}$ , do National Research Council (2006). No entanto, o menor consumo não afetou a estabilidade de peso dos animais e a média (3,71 kg) permaneceu inalterada. O consumo médio de proteína e lipídeos atendeu às necessidades mínimas preconizadas pela Association of American Feed Control Officials (mínimo de 15,50 g de ingestão de proteína e 3 g de lipídeos) para os animais deste experimento que deveriam consumir, em média, 241 kcal/dia. Não houve efeito significativo de tratamentos, o que evidencia que a inclusão de até 0,6% de EPL não afeta a aceitabilidade de dietas úmidas. Esses resultados estão em acordo com os observados por Swanson et al. (2002), com cães que não verificaram efeitos da inclusão de 0,3% de MOS sobre a aceitabilidade.

Em relação aos coeficientes de digestibilidade de energia e nutrientes, não foram observadas diferenças significativas nos resultados, conforme se observa na Tabela 11.

TABELA 11 Coeficientes de digestibilidade de nutrientes e da energia

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
CDMS (%)	74,09	77,60	79,83	78,26	5,15	NS	NS	NS
CDPB (%)	75,15	76,96	80,72	78,08	2,32	NS	NS	NS
CDEE (%)	80,32	82,04	83,47	82,29	7,52	NS	NS	NS
CDMM (%)	39,53	45,05	52,66	50,44	12,91	NS	NS	NS
CDMO (%)	79,03	80,91	82,34	79,31	3,72	NS	NS	NS
CDEB (%)	78,96	80,97	83,09	82,21	3,93	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio; CD: coeficiente de digestibilidade; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; MO: matéria orgânica; EB: energia bruta

Os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes e da energia bruta situaram dentro dos parâmetros de alimentos comerciais para felinos.

Numajiri (2006), ao analisar doze alimentos secos, das categorias padrão e superpremium, para gatos adultos, encontrou valores de digestibilidade da matéria seca que variaram de 64,83% a 81,53%. No entanto, o coeficiente neste trabalho ficou abaixo do encontrado por Lima (2008), que verificou digestibilidade de 80,76%, ao avaliar um alimento úmido para gatos.

Em relação à ausência de efeito pela inclusão do EPL, os resultados observados foram semelhantes ao de Swanson et al. (2002), que trabalharam com cães, mas se opõem aos obtidos por Middelbos et al. (2007), que encontraram um efeito cúbico na digestibilidade da matéria seca, tendo o maior valor sido alcançado com a utilização de 0,25% de parede de levedura e o pior, com 0,65%. Zentek et al. (2002) também verificaram redução significativa da digestibilidade das dietas suplementadas com cerca de 5% de mananoligossacarídeo. Quanto ao coeficiente de digestibilidade da proteína bruta, a ausência de efeitos está em desacordo com o observado nos trabalhos citados anteriormente. Em todos eles, houve diminuição significativa no aproveitamento da proteína, sendo esta a principal causa citada pelos autores para a diminuição no CDMS e no CDMO nestes estudos. As causas para tais efeitos seriam a aglutinação do mananoligossacarídeo à proteína, devido ao acelerado crescimento de bactérias lácticas. Assim, a ausência de efeito significativo sobre a microbiota intestinal nesta pesquisa poderia explicar a manutenção dos coeficientes de digestibilidade da proteína bruta, bem como da matéria seca e da matéria orgânica com a adição de extrato de parede de levedura.

O coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo não foi modificado pela inclusão de EPL na dieta, discordando do efeito cúbico obtido por

Middelbos et al. (2007) que encontraram melhor aproveitamento com o nível de 0,45%.

Por sua vez, o coeficiente de digestibilidade da matéria mineral também situou-se dentro dos parâmetros para alimentos destinados a gatos domésticos que, segundo avaliação feita por Numajiri (2006), podem variar de 16,15% a 49,15%. Lima (2008) verificou maior digestibilidade para a matéria mineral do alimento úmido (45,09%). Mais uma vez, a ausência no aumento do número de bactérias lácticas poderia explicar coeficientes semelhantes para o aproveitamento de minerais. Um crescimento acelerado destas bactérias com produção de ácido láctico poderia levar à diminuição de pH, alterando a solubilização e a retenção destes minerais.

Para o coeficiente de digestibilidade da energia, nenhuma alteração foi verificada. O aproveitamento de proteínas e extrato etéreo não sofreu modificações, o que contribuiria para os resultados observados.

As concentrações de energia digestível das dietas na matéria seca e na matéria natural também não foram influenciadas pelo EPL da dieta e são apresentadas na Tabela 12.

TABELA 12 Energia digestível (kcal/kg) das dietas na matéria seca e na matéria natural

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
EDMS (kcal/dia)	4502,00	4596,00	4775,00	4580,00	4,03	NS	NS	NS
EDMN (kcal/dia)	990,20	1012,00	1051,25	1007,60	4,04	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio; EDMS: energia digestível na matéria seca; EDMN: energia digestível na matéria natural.

Os valores de energia digestível estão em acordo com o previamente calculado pela equação do National Research Council (2006) para este alimento. Os resultados situaram-se dentro do esperado para alimentos destinados a felinos, conforme verificado por Numajiri (2006), que encontrou variações de 3.188,34 a 4.531,34 kcal/kg para a energia digestível na matéria natural e de 3.471,16 a 4.807,47 kcal/kg da mesma na matéria seca. Em relação a alimentos úmidos, Lima (2008) encontrou valores de energia digestível de 4795,25 kcal/kg.

As médias para o escore fecal, estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 Medidas de escore fecal\* em função do teor de extrato de parede de levedura na dieta

<b>Tratamentos (%EPL)</b>	<b>E.F</b>
0,0	3,19
0,2	3,57
0,4	3,20
0,6	3,32
P	0,1786

\*Teste de Kruskal-Wallis- significância  $p < 0,05$ . EF: escore fecal.

Os resultados são um reflexo do que foi observado com a digestibilidade dos nutrientes e nenhuma alteração foi verificada. Isso significa que a adição de EPL não promoveu melhora na qualidade das fezes. De qualquer forma, mais que 40% delas, em todos os tratamentos, apresentaram escore 3 (Tabela 14), compatível com os resultados obtidos com a utilização de alimentos úmidos.

TABELA 14 Distribuição percentual do escore fecal das amostras obtidas dos gatos, em função dos níveis crescentes de EPL na dieta.

<b>Escores</b>	<b>Controle</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>
1	0	0	0	0
2	11	4	15	14
3	59	43	55	45
4	30	46	25	36
5	0	7	5	5
Total	100	100	100	100

Concentrações muito elevadas de EPL poderiam estar associadas à piora no escore fecal pela osmose, embora esses efeitos sejam, em geral, muito menores do que os associados ao excesso de outras substâncias prebióticas. Zentek et al. (2002), utilizando 5% de MOS na dieta de cães, não encontraram diferenças no escore fecal em relação à dieta basal, mas relataram diminuição na matéria seca das fezes, em porcentagem (31,6% para animais suplementados x 36,8% para a dieta basal reestabelecida após a suplementação).

#### **4.1.3 Morfologia intestinal**

##### **4.1.3.1 Avaliação da mucosa intestinal por colonoscopia**

A média de escores obtidos na avaliação colonoscópica foi mais alta no tratamento 4, relativo aos animais que receberam 0,6% de EPL na dieta, conforme demonstrado na Tabela 15.

TABELA 15 Valores de mediana e intervalo de confiança (95%) do escore para aspecto da mucosa intestinal por avaliação colonoscópica

<b>Tratamentos (% EPL)</b>	<b>Escore</b>
0,0	1 (0,81; 1,59)
0,2	1 (0,81; 1,59)
0,4	1(0,92; 1,88)
0,6	3 (2,41; 3,19)
P	0,0106

\*Teste de Kruskal-Wallis- significância  $p < 0,05$ .

Isso indica que uma resposta inflamatória foi induzida nos gatos que receberam esta concentração de EPL (Figura 14). Normalmente, quando se utilizam níveis elevados de prebióticos que são intensamente fermentados, como é o caso dos frutoligossacarídeos, essa agressão à mucosa é causada pelo excesso de produção de ácido lático e ácidos de graxos de cadeia curta, especialmente o butírico. Essa resposta parece não estar associada à produção dessas substâncias pelos grupos bacterianos avaliados neste experimento, já que a contagem total das categorias de microrganismos estudadas não foi alterada pelos tratamentos. No entanto, um estudo mais amplo e específico da microbiota seria necessário para descartar a possibilidade da influência de bactérias nessa resposta. De qualquer forma, a fermentação do mananoligossacarídeo (constituente do EPL) parece ser apenas moderada, o que sugere que outros mecanismos poderiam ter contribuído para essas observações. Sabe-se que o sistema imune inato desempenha um papel crucial na manutenção da integridade do intestino e de proteção contra uma ampla variedade de antígenos (sejam eles bacterianos, físicos ou químicos).



FIGURA 14 Mucosa da fêmea 9, pertencente ao tratamento de 0,6% de EPL, em que se observam áreas eritematosas difusas e edema (escore 3).

Além de funcionar como uma primeira linha de defesa, ele também desencadeia uma série de sinais biológicos que estimulam a resposta imune adaptativa a elaborar uma defesa contra o agente agressor. O muco é rico em imunoglobulina A e, por esse motivo, além da proteção física ao impedir o contato direto do agente com a mucosa, funciona como uma fonte de anticorpos (Nascimento et al., 2007). Uma parte importante da defesa inata é o sistema complemento e, dentre as suas vias de ativação, a da lectina ligadora de manose (MBL) exerce papel fundamental. A lectina poderia se ligar à manose promovendo a ativação do complemento, a opsonização-fagocitose, a modulação da resposta inflamatória e a apoptose.

Embora essa resposta seja benéfica e importante para o organismo animal de forma modulada, algumas doenças inflamatórias têm sido associadas à ativação da MBL. A patogenia delas ainda não está completamente esclarecida, mas tem sido associada a um efeito complexo sobre a liberação de citocinas (interleucinas 1 e 6 e fator de necrose tumoral alfa) pelos monócitos. A ativação inapropriada da MBL tem sido associada a algumas patologias inflamatórias renais e vasculares (Turner, 2003). Assim, o achado deste experimento poderia

estar relacionado a mecanismos imunológicos não avaliados neste trabalho e que poderiam culminar com a vasodilatação que geraria o edema notado na mucosa destes gatos, um possível efeito adverso não verificado em estudos com outras espécies.

A colite observada nos gatos na colonoscopia não foi previamente constatada nas imagens ultrassonográficas, nas quais nenhum espessamento de parede foi encontrado. Isso pode ter ocorrido devido à menor sensibilidade do exame ultrassonográfico frente à histologia.

De qualquer forma, novos experimentos com um maior número de unidades experimentais com essas doses de aditivo são indicados para verificar a repetibilidade dessa resposta. A avaliação da imunidade de animais suplementados com esses níveis também é necessária.

#### **4.1.3.2 Lâminas histológicas e stubs de microscopia eletrônica**

As lâminas histológicas obtidas para cada um dos tratamentos estão apresentadas nas Figuras 15, 16, 17 e 18.

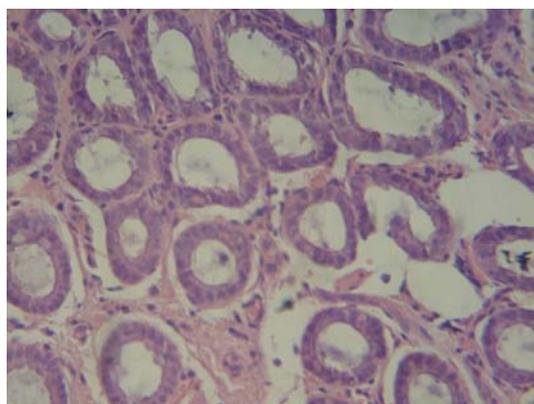


FIGURA 15 Corte transversal do cólon do macho 5, que recebeu o tratamento controle. Aumento 40 x.

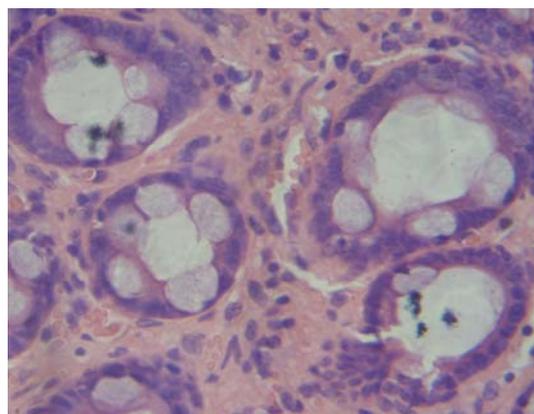


FIGURA 16 Corte histológico do cólon da fêmea 8, que recebeu o tratamento 2 (com suplementação de 0,2% de EPL). Aumento 40 x.

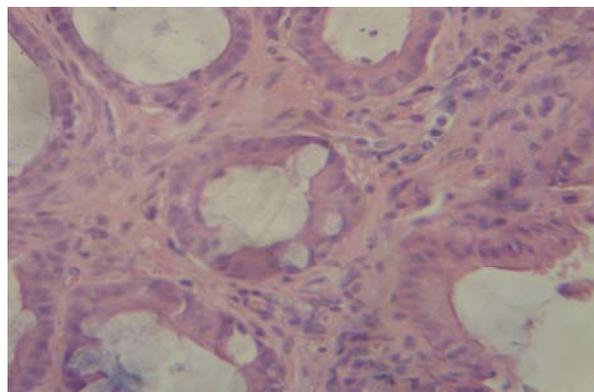


FIGURA 17 Corte histológico do cólon do macho 9, que recebeu o tratamento 3 (com suplementação de 0,4% de EPL). Aumento 40 x.

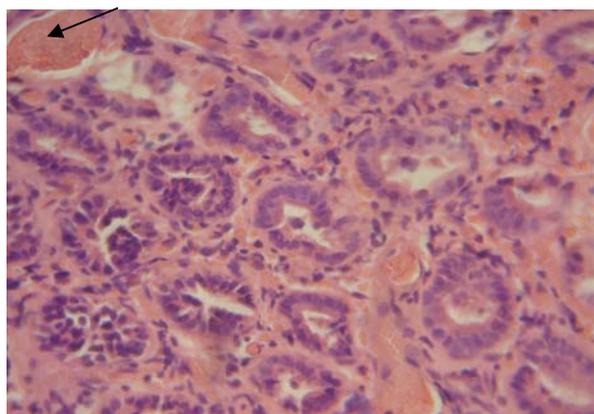


FIGURA 18 Corte histológico do cólon da fêmea 9, que recebeu o tratamento 4 (com suplementação de 0,6% de EPL). Nota-se, no campo superior esquerdo (seta) e em pontos difusos da lâmina, a infiltração de hemácias no tecido, confirmando as alterações morfológicas visualizadas na colonoscopia. Aumento 40 x.

A avaliação morfológica dos tecidos confirmou o que havia sido previamente observado na análise colonoscópica, e a hemorragia e o edema (característicos de colite) observados em todos os animais recebendo o

tratamento 4 (0,6% de EPL) são condizentes com a grande infiltração de hemácias visualizada nas lâminas.

Embora a colonoscopia tenha sido uma ferramenta importante na avaliação das características da mucosa *in vivo*, fornecendo informações valiosas sobre a saúde intestinal, o método de coleta empregado nesta técnica (através de pinças) não permitiu a obtenção de material que possibilitasse a avaliação da base das criptas intestinais e, assim, o índice mitótico não pode ser realizado.

De qualquer forma, sabe-se que a manutenção de tamanho de criptas é decorrente do equilíbrio entre os processos de renovação celular (proliferação e diferenciação realizada pelas células tronco localizadas na base) e de perda de células (que ocorre no ápice). Esses dois, em conjunto, são responsáveis pela determinação do *turnover* celular (síntese-migração-extrusão) constante. Quando o intestino responde a algum agente, aumentando a taxa de replicação, com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, o número de células aumentaria e as vilosidades e criptas estariam maiores em altura (Pelicano et al., 2003). Este seria o efeito de hiperplasia e de hipertrofia relatado para diversas substâncias prebióticas.

Assim, sendo o número de células intestinais uma relação entre a mitose e a descamação, a contagem dos colonócitos e de caliciformes, bem como o estabelecimento da relação entre elas, podem trazer informações iniciais sobre a histologia do cólon (já que informações sobre as características micromorfológicas nesse órgão em felinos ainda são escassas), bem como das alterações desta sob a influência do mananoligossacarídeo. Isso porque a alteração na taxa de renovação celular poderia desequilibrar os processos, aumentando o número de células em qualquer ponto da cripta.

O número de colonócitos e de células caliciformes, bem como a relação células caliciformes/colonócitos, está demonstrado na Tabela 16.

TABELA 16 Morfologia intestinal (número de colonócitos e células caliciformes) dos gatos alimentados com e sem EPL na dieta

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
COL (n°)	567,25	542,60	498,75	506,25	11,81	NS	NS	NS
CAL (n°)	47,50	95,8	27,75	69,00	39,61	NS	NS	0,0173 <sup>1</sup>
RCC	0,09	0,17	0,06	0,15	66,44	NS	NS	0,0192 <sup>2</sup>

p\*: significância  $p < 0,05$ ; <sup>1</sup>R<sup>2</sup> = 0,3660; <sup>2</sup>R<sup>2</sup> = 0,3572 CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio COL: colonócitos (células epiteliais); CAL: células caliciformes; RCC: relação caliciforme/colonócito.

Não houve diferenças significativas no número de células epiteliais com a suplementação de EPL na dieta, o que confirma resultados encontrados em pesquisas com outras espécies, como suínos e frangos de corte. Da mesma forma, nenhum efeito linear ou quadrático sobre a produção de células caliciformes e na relação colonócitos-células caliciformes foi encontrado.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura podem ser vistas na Figura 19.

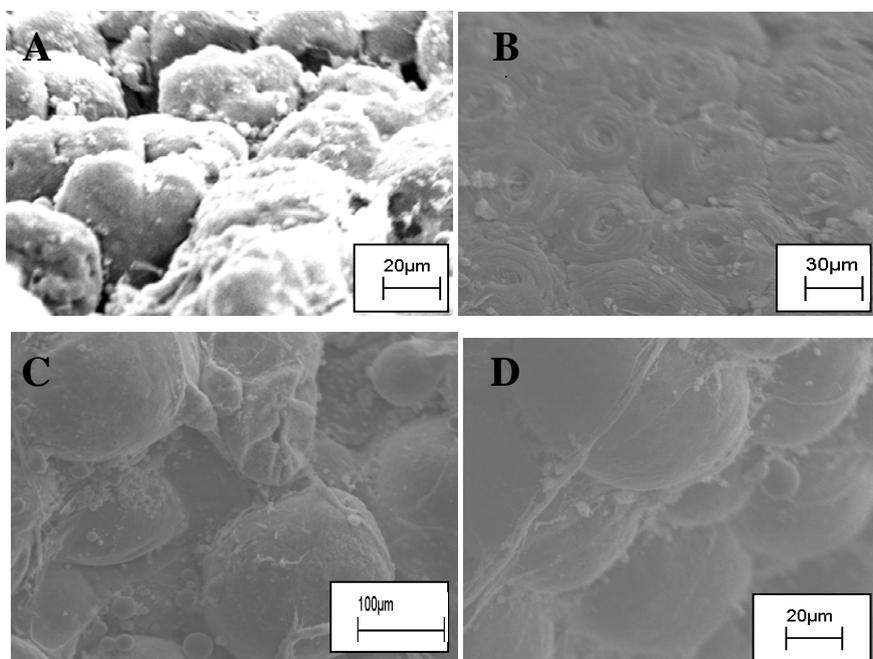


FIGURA 19 Vista eletromicrográfrica das mucosas do cólon dos gatos submetidos a dietas sem e com extrato seco de parede de levedura. (A) macho 9 (tratamento 3); (B) macho 7 (tratamento 2); (C) e (D) macho 2 (controle).

Não foi possível visualizar alterações morfológicas ou da camada de muco nos stubs da microscopia de varredura. Algumas das imagens possibilitaram a observação individual de cada uma das criptas intestinais, mas sem que se conseguissem realizar avaliações morfométricas. O uso da microscopia eletrônica de transmissão em experimentos posteriores pode fornecer maiores informações a respeito de alterações morfológicas sofridas por células epiteliais ou caliciformes.

Os resultados para a morfologia intestinais, obtidos neste experimento, forneceram informações iniciais importantes a respeito dos efeitos do EPL no intestino de felinos. No entanto, sugere-se que novas técnicas de coleta e de

análise histológica sejam estudadas, para melhor avaliação da hiperplasia e/ou hipertrofia de colonócitos e células caliciformes em gatos domésticos.

#### 4.1.3.3 Imagens ultrassonográficas

As médias para as mensurações da parede do cólon dos gatos estão demonstradas na Tabela 17.

TABELA 17 Espessura da parede intestinal (mm) dos gatos em função dos níveis crescentes de EPL na dieta

Variável	Tratamentos (% EPL)					p*		
	0	0,2	0,4	0,6	C.V	L	Q	D
EPI (mm)	1,39	1,29	1,19	1,45	13,44	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L = efeito linear, Q: efeito quadrático, D: desvio; EPI: espessura de parede intestinal.

As medidas encontram-se dentro da média observada para a espécie por Newell (1999), de 1,67 mm. Não foi verificado nenhum efeito significativo da adição de EPL à dieta sobre a espessura da parede do cólon, o que evidencia a ausência de hipertrofia.

A ultrassonografia foi uma ferramenta diagnóstica auxiliar importante para a observação das camadas murais, trazendo informações iniciais sobre a saúde intestinal. Por tratar-se de um exame não invasivo, é uma alternativa vantajosa e poderia ser utilizada em novos estudos, para a avaliação do intestino de gatos domésticos.

#### 4.1.4 Produção de gás intestinal (imagens radiográficas)

Em relação às metodologias utilizadas para a mensuração neste estudo, notou-se que os valores para área de gás, em  $\text{cm}^2$ , associaram-se às medidas de escore (Figura 20).

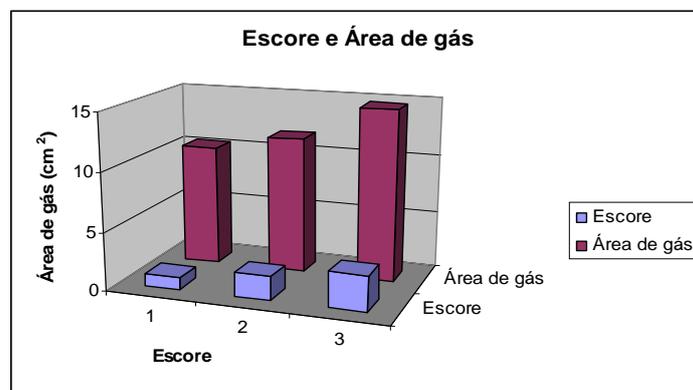


FIGURA 20 Associação de escore e área de gás, em cm<sup>2</sup>

A média das áreas para as radiografias classificadas como escore 1, 2 e 3 foram de 10,34, 11,71 e 14,73 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Esses resultados demonstram que o programa poderia ser utilizado para fornecer medidas quantitativas da produção de gás intestinal.

Trabalhos anteriores (Feliciano, 2008; Maia, 2008) haviam demonstrado que as medidas apresentavam alto coeficiente de variação (em torno de 70%) que, em parte, se devia a uma falta de acurácia do programa em separar as áreas de gás (radiotransparentes) das regiões de tecidos moles. Como na imagem negativa, o gás assumiria a cor branca e as regiões cinzas mais escuras, representadas por tecidos moles, poderiam ser convertidas para a mesma coloração, o que proporcionaria medidas irreais. Nesse sentido, a delimitação prévia das radiografias possibilitou diminuição significativa do coeficiente de variação dos dados para cerca da metade do observado nos experimentos anteriores (33,97%), embora a homogeneidade de variâncias não tenha sido respeitada para a realização da estatística paramétrica.

Por se tratar de uma metodologia nova, a medida, em cm<sup>2</sup>, dificulta a comparação com outras pesquisas nas quais a avaliação da produção de gás

também foi realizada, já que esta mensuração é realizada em volume. Conforme anteriormente proposto por Feliciano (2008), os exames radiográficos em outros posicionamentos, como o ventro-dorsal, pode oferecer uma visualização mais ampla das alças intestinais, avaliando-se, de forma mais efetiva, a formação de gás nesses animais, facilitando as interpretações.

Dessa forma, verificou-se que a técnica de mensuração de gás via radiografia é promissora, no entanto, alguns ajustes ainda precisam ser realizados para maior precisão dos resultados.

As áreas de gás intestinal, bem como os respectivos escores, estão demonstradas na Tabela 18.

TABELA 18 Área de gás intestinal (cm<sup>2</sup>) e escore de gás das radiografias dos gatos, em função do nível de EPL da dieta

<b>Tratamentos (% EPL)</b>	<b>Médias</b>	
	<b>AG (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>EGI</b>
0,0	12,40	1,80
0,2	12,11	2,40
0,4	12,07	2,20
0,6	10,24	1,40
p	0,7544	0,2338

\*Teste de Kruskal-Wallis- significância p<0,05. AG: área de gás; EGI: escore gás intestinal.

Não foram encontradas diferenças significativas para o escore, em função da adição de EPL à dieta. A média geral de 1,95 indica que houve uma produção moderada de gás intestinal em todos os animais. Tais resultados estão em acordo com os obtidos por Feliciano (2008), que encontrou média geral de 1,75, ao verificar o efeito de probióticos na produção de gás intestinal de cães, sem influência de tratamentos.

As áreas de gás, em cm<sup>2</sup>, também não se alteraram, diferindo dos resultados encontrados por Feliciano (2008), em que um probiótico à base de

lactobacilos, enterococos e pediococos gerou menor produção de gás intestinal. No entanto, é preciso considerar que fermentação é dependente da atividade e da composição da microbiota e, na pesquisa citada, houve uma alteração desta, o que explicaria os resultados encontrados por este autor.

No caso do presente estudo, o número dos microrganismos dos grupos avaliados não foi modificado pelos tratamentos e as concentrações similares eram esperadas. Os resultados deste experimento discordam dos obtidos Zentek et al. (2002), ao utilizarem a metodologia *in vitro* para verificar a produção de gás pela microbiota intestinal de cães exposta a diversos oligossacarídeos. Neste trabalho, verificou-se o aumento na produção de gás com a suplementação de MOS, em comparação à dieta padrão. No entanto, a ampla diversidade de metodologias empregadas não possibilita uma comparação fiel das duas pesquisas.

## 4.2 Experimento 2

### 4.2.1 Consumo

Os resultados para o consumo de dietas com e sem a inclusão de extrato de parede de levedura estão apresentados na Tabela 19.

TABELA 19 Consumo (g) e consumo na matéria seca (g) de dietas com ou sem adição de extrato seco de parede de levedura.

Variável	Consumo	Consumo MS
Controle	143,08 <sup>a</sup>	34,89 <sup>a</sup>
EPL	112,18 <sup>b</sup>	28,89 <sup>b</sup>

O consumo ocorreu dentro da necessidade energética diária calculada pela equação  $100 \times PV^{0,67}$  do National Research Council (2006). Houve efeito significativo negativo da inclusão de 0,4% de extrato seco de parede de levedura sobre a palatabilidade da dieta.

Há algum tempo tem sido relatada uma ambiguidade na percepção do sabor da D-manose nos dois principais anômeros dessa substância. Enquanto a alfa-D-manose é fortemente adocicada (tipo sucrose), a beta D-manose apresenta gosto amargo (tipo quinina) (Steinhardt et al., 1962). A única diferença entre essas duas formas de manose é a troca no posicionamento do H e da OH no carbono 1 do anel de piranose. No entanto, essa diferença é suficiente para atuar em receptores distintos, provocando sensações diferentes ao paladar. Se uma mistura estiver em equilíbrio entre essas duas estruturas, é possível que um efeito ambíguo seja encontrado (Stewart et al., 1971).

Sabe-se que os felídeos não são capazes de detectar os sabores adocicados provenientes dos carboidratos, provavelmente devido a uma deficiência da proteína T1R2, pela ausência da expressão de um pseudogene relacionado (Li et al., 2005). Além disso, parecem possuir um receptor análogo ao amargo de seres humanos, respondendo de forma adversa a substâncias como quinina, tanino e alcaloides. Assim, a presença de um sabor levemente adocicado e/ou amargo, gerado por este nível de inclusão (o de 0,4%), pode ter sido o responsável pela resposta negativa do EPL sobre a palatabilidade.

O MOS presente no EPL poderia ter efeito semelhante ao de edulcorantes artificiais no estímulo aos receptores. A sacarina, por exemplo, foi rejeitada por gatos, na concentração de 0,0001 M (Bartoshuk et al., 1975).

Não há estudos avaliando os efeitos de EPL sobre o consumo de alimentos em felinos domésticos (National Research Council, 2006). Testes de palatabilidade com níveis maiores ou menores do que os utilizados neste estudo não foram realizados e, por esse motivo, os resultados obtidos sugerem indicar

que cuidados adicionais com a palatabilidade da dieta sejam tomados quando a inclusão de EPL for realizada.

#### **4.2.2 Razão de ingestão**

A razão de ingestão (Griffin, 2004, citado por Carciofi, 2006) permitiu verificar que, das 120 observações realizadas, 58,33% dos animais preferiram a dieta sem EPL, 34,17% com a inclusão de EPL e 7,50% não tiveram preferência por nenhum dos alimentos testados, confirmando o que havia sido constatado na avaliação do consumo. Este resultado era esperado, já que os pesos dos gatos eram semelhantes e, quando testados como covariáveis na análise estatística, não apresentaram efeito significativo.

No entanto, conforme citado por Lima (2008), a utilização da técnica de Griffin tem como vantagem a mensuração da porcentagem de animais indiferentes à palatabilidade das dietas, fornecendo uma informação adicional e importante.

### **4.3 Experimento 3**

#### **4.3.1 Microbiologia das fezes, água e dietas**

A análise de coliformes totais e termotolerantes da água e das dietas experimentais não acusou a presença de microrganismos contaminantes.

##### **4.3.1.1 Caracterização e frequência de distribuição das colônias nas fezes**

O cultivo laboratorial das amostras de fezes dos felinos em meio EMB possibilitou a observação de 10 colônias com características fenotípicas distintas, conforme descrito: 1 - centro enegrecido e halo verde metálico; 2 - roxas com centro enegrecido e presença de halo róseo escuro; 3 - roxas com centro enegrecido sem a presença de halo; 4 - róseas escuras; 5 - arroxeadas com a presença de halo róseo; 6 - róseas apresentando halos esbranquiçados; 7 -

róseas de tonalidade clara, sem halo; 8 - roxas com halo lilás; 9 - róseas com halo rosa de tonalidade clara; 10 - centro róseo/arroxeadado e apresentando halo arroxeadado/esverdeado (Figura 21).

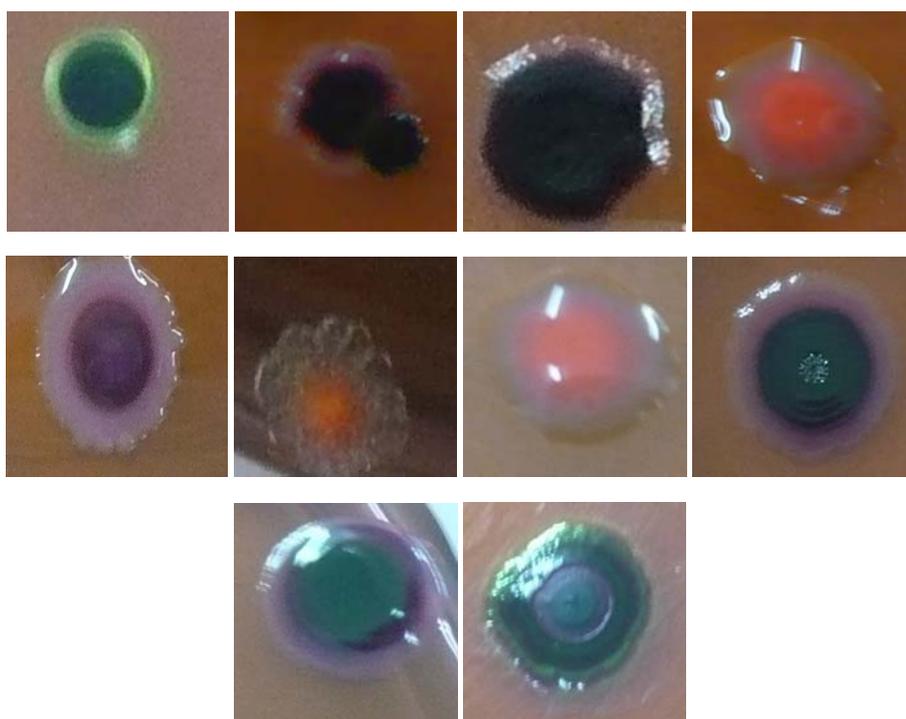


FIGURA 21 Colônias isoladas nas placas de EMB, por ordem de enumeração, da esquerda para a direita: 1 a 11.

A frequência de distribuição dessas colônias em função dos tratamentos está demonstrada na Tabela 20.

TABELA 20 Distribuição percentual das colônias isoladas nas placas de eosina-azul de metileno (EMB).

Colônias (%)	Tratamentos (% EPL)			
	0	0,2	0,4	0,6
1	0,61	0,04	0,00	0,00
2	48,26	56,17	60,35	93,91
3	16,84	0,00	13,02	0,00
4	19,89	29,24	0,00	5,97
5	7,43	12,72	8,77	0,00
6	0,00	0,11	0,00	0,00
7	0,00	1,72	0,00	0,00
8	0,00	0,00	15,82	0,12
9	6,97	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	2,04	0,00
<b>Total</b>	100	100	100	100

Notou-se maior concentração das colônias 2, 3 e 4, em todos os animais estudados. As demais não se apresentaram em proporções consideráveis ou foram relegadas a um único tratamento, com exceção da colônia número 5, que se distribuiu nos três primeiros, mas estava ausente no tratamento de 0,6%. O baixo percentual de algumas das colônias descritas neste experimento pode ser devido à contaminação ambiental ou, mesmo, à expressão fenotípica diferenciada.

Sabe-se que, embora as colônias bacterianas apresentem características específicas em um determinado meio de cultura, condições de crescimento (como o tempo de desenvolvimento da colônia, a interação/competição com

outras bactérias, entre outros) podem interferir decisivamente sobre a expressão destas.

Das onze colônias encontradas, três (as de número 1,2 e 3) foram confirmadas como *E. coli* pelo teste de IMViC (Figura 22), associado à coloração de Gram (Figura 23). Estas colônias se apresentaram como bastonetes gram-negativos e responderam negativamente ao citrato e ao Voges-Proskauer, mas positivamente para o indol e o vermelho de metila.

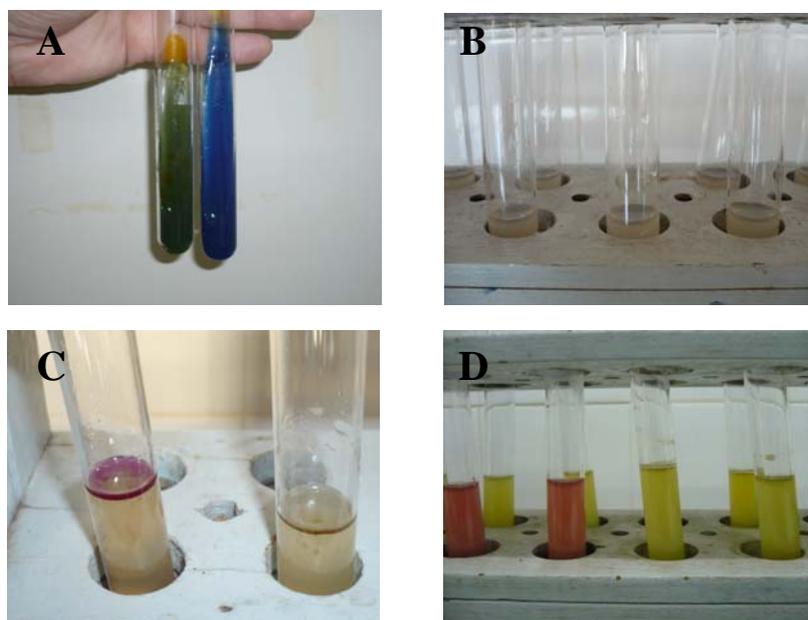


FIGURA 22 Teste de IMViC. (A) à esquerda (tubo verde), teste citrato negativo; (B) Voges Proskauer negativo; (C) à esquerda (anel róseo), indol positivo; (D) à esquerda (tubos vermelhos), teste de vermelho de metila positivo.

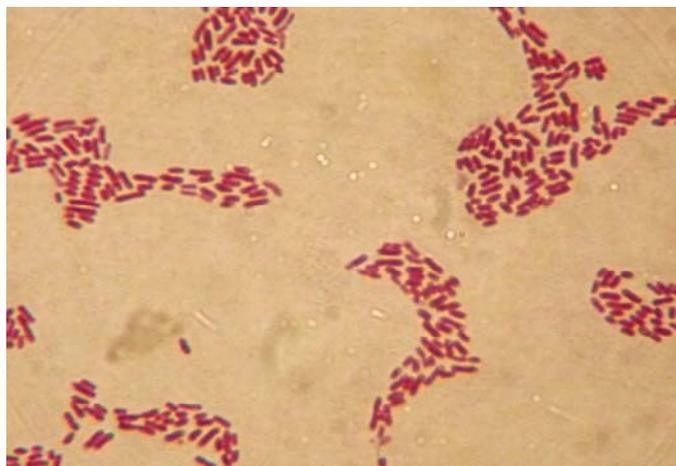


FIGURA 23 Bastonetes gram-negativos correspondentes à colônia número 3.

A *E. coli* representou 72,30% de todas as enterobactérias isoladas neste experimento. Em relação às bactérias lácticas, as colônias isoladas no meio de Man, Rogosa e Sharpe estão demonstradas na Figura 24.



FIGURA 24 Bactérias lácticas isoladas no MRS

Em meio MRS, as colônias eram pequenas, em formato puntiforme ou arredondado, brancas e sem presença de halos.

#### 4.3.1.2 Contagens de enterobactérias, *E. coli* e bactérias lácticas nas fezes

Não houve diferenças significativas para as contagens de Enterobacteriaceae, *E. coli* ou bactérias lácticas, bem como para a relação entre bactérias lácticas e *E. coli*, conforme apresentado na Tabela 21.

TABELA 21 Contagem total de bactérias do ácido-lático, enterobactérias e *E. coli* em log/g de fezes na matéria original

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
BAL (log/g MO)	8,33	7,93	8,76	7,85	15,07	NS	NS	NS
EBT (log/g MO)	6,47	5,74	6,31	5,80	14,56	NS	NS	NS
<i>E. coli</i> (log/g MO)	5,94	5,41	6,05	5,34	14,29	NS	NS	NS
REL	1,46	1,46	1,48	1,46	17,71	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L:efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio. MO: matéria original; BAL: bactérias ácido-láticas; EBT: *Enterobacteriaceae*; REL: relação bactéria láctica/*E. coli*.

O número de bactérias lácticas em log/g de fezes na matéria original neste experimento situou-se abaixo do observado no ensaio com dieta úmida. As maiores concentrações de vitaminas de dietas úmidas em relação às secas (National Research Council, 2006) podem ter influenciado na maior concentração deste grupo no primeiro ensaio, já que um dos principais gêneros de bactérias lácticas, o *Lactobacillus* sp., apresenta alta exigência de vitaminas (Mandigan et al., 2004).

Outro fator importante a considerar é que as populações bacterianas variam amplamente de um momento a outro, dependendo das condições de

estresse (já que neurotransmissores influenciam diretamente o estabelecimento da microbiota) e do contato do animal com o ambiente e com outros indivíduos (Kaprelyants & Kell, 1996).

Níveis de extrato de parede de levedura semelhantes aos utilizados no presente ensaio têm sido efetivos em outras espécies de animais monogástricos, inclusive cães (Middelbos et al., 2007), para modular a microbiota intestinal a partir da ação sobre a *E. coli*. No entanto, o mecanismo de atuação do MOS (presente no EPL) é restrito às bactérias fimbria tipo 1 e ainda não há relatos ou estudos que comprovem a porcentagem destas no intestino de felinos. Em frangos, elas chegam a 68% do total de bactérias da espécie (Finucane et al., 1999).

Efeitos das concentrações de EPL sobre a contagem total de enterobactérias também não foram encontradas. A redução seria esperada, caso a interação do MOS com a *E.coli* tivesse ocorrido.

#### **4.3.2 Ácidos graxos de cadeia curta**

Os resultados para a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) estão demonstrados na Tabela 22.

TABELA 22 Concentração de ácidos graxos de cadeia curta em  $\mu\text{mol/g}$  de matéria seca de fezes.

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
Total ( $\mu\text{mol/g MS}$ )	441,19	313,60	420,56	381,72	6,90	NS	NS	NS
Acético ( $\mu\text{mol/g MS}$ )	285,38	210,45	275,00	243,35	6,18	NS	NS	NS
Propiônico ( $\mu\text{mol/g MS}$ )	120,16	58,92	93,31	105,23	11,72	NS	NS	NS
Butírico ( $\mu\text{mol/g MS}$ )	35,65	44,22	52,24	33,14	22,57	NS	NS	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; C.V: coeficiente de variação; L:efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio.MS: matéria seca;  $^1R^2=0,2819$

As concentrações totais médias de AGCC situaram-se dentro dos padrões estabelecidos para felinos alimentados com dietas comerciais que são, normalmente, inferiores a  $600 \mu\text{mol}$  (Brosey et al., 2000). A proporção molar média foi de 65,23% para o acético; 23,94% para o propiônico e 10,82% para o butírico, que são valores semelhantes aos descritos por Swanson et al. (2002) para cães. Nenhum efeito da inclusão de EPL na dieta foi encontrado sobre as concentrações de AGCC. Esses resultados são contrastantes com os observados em outras espécies. Em perus, por exemplo, a concentração de ácidos graxos totais foi significativamente menor em animais alimentados com MOS devido a uma diminuição na concentração de ácido propiônico (Zdunczyk et al., 2005).

Os ácidos graxos de cadeia curta são provenientes da fermentação bacteriana no cólon (Commane et al., 2005) e o ácido láctico é um dos principais produtos envolvidos na formação deles. A manutenção da população de bactérias lácticas bem como a não interferência sobre o número de *E. coli* pode ter contribuído para a obtenção de resultados similares nas concentrações totais. Estudos sobre a microbiota intestinal de felinos domésticos e o seu

comportamento na produção de ácidos graxos de cadeia curta são necessários e poderão esclarecer esses pontos no futuro.

#### 4.3.3 Redução de odor de fezes e nitrogênio amoniacal

As médias para o escore de percepção de odor das fezes e de nitrogênio amoniacal estão demonstradas na Tabela 23.

TABELA 23 Concentração de nitrogênio amoniacal (mg%) e escore para odor de fezes em função dos tratamentos

Variável	Tratamentos (% EPL)				p*
	0	0,2	0,4	0,6	
Namoniacal (mg %)	0,82	1,96	0,69	1,45	NS
Escore	2,00	2,43	2,04	2,10	0,0229

\*Teste de Kruskal-Wallis- significância  $p < 0,05$ .

A concentração de nitrogênio amoniacal nas fezes dos gatos foi semelhante, independentemente dos tratamentos. É importante considerar que a alta variabilidade da mensuração desta característica pode ter influenciado a ausência de diferenças estatísticas, já que a concentração numérica no tratamento de 0,4% foi menos da metade da maior concentração observada no tratamento de 0,2% (coeficiente de variação de 90%) A alta variabilidade na mensuração destas substâncias já foi anteriormente relatada por Swanson et al. (2002), que creditaram este acontecimento à baixa concentração desses metabólitos nas fezes. Assim, em futuros experimentos, um número maior de animais pode ser necessário para avaliar com maior acurácia o teor fecal de nitrogênio amoniacal.

Os resultados encontrados estão em acordo com os verificados por estes mesmos autores, ao utilizarem 0,3% de MOS em dietas para cães. Nesta

pesquisa, as altas concentrações proteicas (36,8%) podem ter interferido decisivamente no resultado. Dietas para gatos possuem, naturalmente, altos níveis de proteína (neste experimento, 34% da matéria seca da dieta) que, adicionados à particularidade destes quanto ao metabolismo proteico, poderiam ter contribuído para que diferenças maiores sobre a concentração de nitrogênio amoniacal não fossem observadas. Hesta et al. (2003), estudando frutoligossacarídeos, observaram efeito inibidor de níveis elevados de proteína na dieta sobre a redução de amônia nas fezes de cães.

Quanto ao escore de redução de odor, observou-se ligeiro efeito positivo da inclusão de 0,2% de EPL na dieta. Os voluntários atribuíram uma média de escore de 2,40 para as fezes provenientes de animais do tratamento 2, o que a colocaria entre as classificações igual ao padrão e ligeiramente melhor que o padrão. Os tratamentos com 0,4% e 0,6% de EPL também apresentaram escores ligeiramente superiores que as fezes dos animais controle (2,04 e 2,10, respectivamente), no entanto, sem efeito estatístico significativo. De forma não esperada, os voluntários classificaram a amostra que apresentou numericamente o maior teor de nitrogênio amoniacal como a que demonstrou o melhor potencial para a redução de odores.

Afora a subjetividade do teste sensorial, a possível explicação para o resultado encontrado é que o odor de fezes é resultante de uma combinação de diversas substâncias que, além dos compostos oriundos do metabolismo proteico (como amônia, aminas biogênicas, indóis, etc.). Também incluem os ácidos graxos e que a junção de todos estes elementos é mais importante do que a presença ou a ausência de um componente isolado (Lowe et al., 1997). No presente experimento, a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta, inclusive o acético, foi menor no tratamento de 0,2%, o que pode ter contribuído para uma resposta positiva por parte dos examinadores. Embora o limiar para a percepção de ácidos graxos (6,9 mg/L para o acético) seja bem maior que para a

amônia (1 µg/L) (Lowe et al., 1997), o tratamento 2 pode ter interferido positivamente sobre a combinação das substâncias componentes do mau odor.

É preciso considerar que a subjetividade e as interferências que a avaliação sensorial sofre podem levar a resultados distintos dos mostrados por mensurações químicas, mas, por outro lado, trata-se de uma metodologia importante para efeitos práticos, pois é justamente o proprietário de gatos que fará a avaliação e adquirirá diretamente os produtos comerciais com ou sem inclusão de aditivos. Experimentos posteriores com a mensuração de outros compostos relacionados ao odor (aminas biogênicas, cetonas, indóis, aldeídos) e a repetição de novos testes sensoriais podem esclarecer não só a relação entre as metodologias, mas o potencial do mananoligossacarídeo como melhorador de odor.

#### **4.4 Experimento 4**

##### **4.4.1 Digestibilidade de nutrientes e escore fecal**

Os resultados para o consumo de alimentos estão demonstrados na Tabela 24.

TABELA 24 Consumo de nutrientes (g/dia) e de energia (kcal/dia) dos gatos, em função do teor de EPL da dieta

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
CMS	49,23	45,75	34,87	50,63	24,43	NS	0,0414 <sup>1</sup>	NS
CPB	17,15	16,46	12,31	18,66	24,85	NS	0,0319 <sup>2</sup>	NS
CMM	3,48	3,40	2,59	3,75	24,02	NS	NS	NS
CMO	45,75	42,35	32,27	46,87	24,48	NS	0,0422 <sup>3</sup>	NS
CEB	250,22	228,16	176,02	256,30	24,54	NS	0,0319 <sup>4</sup>	NS

p\*: significância  $p < 0,05$ ; CV: coeficiente de variação; L:efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio; CMS: consumo de matéria seca; CPB: consumo de proteína bruta; CMM: consumo de matéria mineral; CMO: consumo de matéria orgânica; CEB: consumo de energia bruta; <sup>1</sup>CMS=  $50,93 - 75,53 \text{trat} + 120,31 \text{trat}^2$ ;  $R^2 = 0,6209$ ; <sup>2</sup>CPB =  $17,84 - 26,24 \text{trat} + 44,06 \text{trat}^2$ ;  $R^2 = 0,5600$ ; <sup>3</sup>CMO=  $47,32 - 70,84 \text{trat} + 112,45 \text{trat}^2$ ;  $R^2 = 0,6289$ ; <sup>4</sup>CEB=  $258,34 - 400,70 \text{trat} + 639,58 \text{trat}^2$ ;  $R^2 = 0,6696$

A média geral para o consumo de matéria seca esteve, em média, 25% abaixo das exigências calculadas pela equação  $100 \times PV^{0,67}$ . Dessa forma, consumos de proteína bruta, matéria orgânica e energia bruta também sofreram alterações, mas a ingestão proteica atendeu às necessidades preconizadas pela Association of American Feed Control Officials (AAFCO) (2007). Houve efeito quadrático da inclusão de MOS sobre o consumo de matéria seca dos gatos, tendo o mais alto sido obtido com o tratamento de 0,6%. Estes resultados não estão em acordo com os observados no primeiro ensaio experimental deste estudo, em que médias semelhantes foram encontradas. O ensaio de palatabilidade demonstrou que o mananoligossacarídeo influencia negativamente o consumo de dietas úmidas a partir de 0,4% de inclusão, que foi a menor ingestão observada neste experimento. Mas, essa observação levaria a sugerir que a inclusão de níveis maiores (como o do tratamento 4) também reduziria o consumo, o que não ocorreu..

Os resultados para o coeficiente de digestibilidade dos nutrientes e energia estão apresentados baixo na Tabela 25.

TABELA 25 Coeficientes de digestibilidade de nutrientes e da energia em função dos níveis de extrato seco de parede de levedura na dieta.

Variável	Tratamentos (% EPL)				CV	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
CDAMS (%)	72,89	71,64	75,42	75,52	3,66	0,0465 <sup>1</sup>	NS	NS
CDAPB (%)	77,10	76,57	78,95	79,62	3,38	NS	NS	NS
CDAMM (%)	29,16	27,18	32,53	34,71	32,00	NS	NS	NS
CDAMO (%)	78,07	75,21	78,87	78,80	2,92	NS	NS	NS
CDEB (%)	79,88	78,44	81,63	81,56	2,68	0,0396 <sup>2</sup>	NS	0,0474 <sup>3</sup>

p\*: significância  $p < 0,05$ ; C.V: coeficiente de variação; CDMS: coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDPB: coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDMM: coeficiente de digestibilidade da matéria mineral; CDMO: coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica; CDEB: coeficiente de digestibilidade da energia bruta; CMEB: coeficiente de metabolização da energia bruta.<sup>1</sup>  $R^2: 0,6161$ ,  $y = 72,1178 + 5,8340x$ ; <sup>2</sup> $R^2: 0,2844$ , <sup>3</sup> $R^2: 0,5537$ ;

Nenhum efeito significativo para os coeficientes de digestibilidade da proteína bruta, da matéria mineral, da matéria orgânica e de metabolização de energia foi observado pela adição de MOS à dieta. Tais resultados não confirmam os encontrados por Swanson et al. (2002) e Zentek et al. (2002) para cães em que uma diminuição da utilização da proteína bruta foi verificada. Também não estão de acordo com o trabalho de Oliveira et al. (2007) que, utilizando frangos de corte, encontraram efeitos significativos da adição de MOS sobre a digestibilidade da proteína bruta. No entanto, esses resultados são semelhantes aos de Utiyama (2004) que, ao utilizar mananoligossacarídeo para frango de corte, não encontrou diferenças no CDAPB e aos do primeiro ensaio

experimental deste estudo, no qual uma dieta úmida foi oferecida aos animais, sem efeitos significativos sobre a digestibilidade de nutrientes.

No entanto, neste experimento, foi possível observar um efeito linear significativo sobre a matéria seca, o que poderia ser atribuído à melhora na digestibilidade da fibra, do extrativo não nitrogenado ou, até mesmo, do extrato etéreo, não avaliados. Em um trabalho realizado por Middelbos et al. (2007), com a utilização de parede de levedura para cães, houve efeito cúbico sobre a digestibilidade da fibra insolúvel, com as melhores respostas sendo atribuídas à inclusão de 0,25% e 0,65% (42,0% e 32,4% de digestibilidade, respectivamente), assim como do extrato etéreo ácido, que teve seus maiores valores no tratamento de 0,45%, conforme citado anteriormente.

Já Zentek et al. (2002) observaram maior digestibilidade da fibra bruta e menor digestibilidade dos extrativos não nitrogenados em cães suplementados com MOS, sem qualquer efeito sobre o extrato etéreo. Em relação à utilização dos carboidratos, embora os felinos sejam animais estritamente carnívoros e apresentem metabolismo neoglicogênico com menor resposta a altas concentrações de glicose por deficiência na atividade de enzimas como a serina-piruvato amino-transferase, a desidratase e a glicoquinase, eles podem apresentar boas digestibilidades de fontes de carboidratos como arroz (82,78% de CDAMS) e milho (78,50% de CDAMS) (Carciofi & Oliveira, 2004), que faziam parte da composição da dieta comercial utilizada neste experimento.

Além disso, a suplementação com EPL pode aumentar a viscosidade da dieta, diminuindo a taxa de passagem e permitindo um aumento do tempo de exposição da digesta às enzimas digestivas (Middelbos et al., 2007). No entanto, esperaria-se que maiores viscosidades fossem obtidas com os maiores níveis de suplementação, o que não ocorreu no experimento de Middelbos et al. (2007) e parece não ter ocorrido neste experimento.

Já o coeficiente de digestibilidade da energia bruta mostrou efeito linear, com um aumento significativo de 0,4% e 0,6% em relação ao controle, o que acompanharia as alterações observadas na digestibilidade da matéria seca. No entanto, é necessário considerar que uma leve queda no tratamento de 0,6% gerou simultaneamente um efeito desvio e que o R<sup>2</sup> das equações foi muito baixo, o que inviabiliza o modelo de regressão para explicar tal alteração. O maior valor de digestibilidade de energia (81,63%) obtido com 0,40% de EPL na dieta foi semelhante ao encontrado por Middelbos et al. (2007) com cães, em cujo trabalho 0,45% possibilitou a obtenção de 89,7% de digestibilidade. Os resultados também estão de acordo com menores valores de digestibilidade para todos os nutrientes encontrados no trabalho do autor mencionado, quando a suplementação de 0,25% foi realizada, já que os coeficientes mais baixos neste estudo foram encontrados no tratamento 2. Por sua vez, o coeficiente de metabolicidade corrigido de energia bruta mostrou efeito desvio (cúbico) seguindo o padrão do CDAEB.

Os valores de energia digestível e de energia metabolizável estão apresentados na Tabela 26.

TABELA 26 Energia digestível e metabolizável corrigida (kcal/kg) das dietas na matéria seca e na matéria natural, em função dos teores de EPL na dieta

Variável	Tratamentos (% EPL)				C.V	p*		
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q	D
EDMN (kcal/kg)	3769,61	3623,29	3825,18	3832,11	2,27	0,0366	NS	0,0058 <sup>1</sup>
EDMS (kcal/kg)	4060,11	3912,33	4120,71	4128,61	2,28	0,0402	NS	0,0084 <sup>2</sup>

p\*: significância p< 0,05; CV: coeficiente de variação; L: efeito linear; Q: efeito quadrático; D: efeito desvio; EDMS: energia digestível na matéria seca; EDMN: energia digestível na matéria natural; <sup>1</sup>R<sup>2</sup>=0,5474; <sup>2</sup>R<sup>2</sup>=0,5229; <sup>3</sup>R<sup>2</sup>=0,5418

A média geral de energia digestível (3763 kcal/kg) situou-se dentro do previamente calculado pela equação do National Research Council (2006) (3600 kcal/kg). Conforme ocorrido anteriormente com o coeficiente de digestibilidade, os valores de energia digestível na matéria seca e na matéria natural apresentaram, simultaneamente, efeito linear e cúbico, mas com valores baixos de  $R^2$ , o que indica que o modelo não poderia explicar bem as alterações sofridas pelos dados.

As médias para escore fecal estão demonstradas na Tabela 27.

TABELA 27 Medidas de escore fecal em função do nível de EPL na dieta

<b>Tratamentos (% EPL)</b>	<b>Médias</b>
	<b>E.F</b>
0,0	3,55
0,2	3,37
0,4	3,05
0,6	3,30
p	0,3619

\*Teste de Kruskal-Wallis- significância  $p < 0,05$ . EF: escore fecal.

Não houve diferença estatística significativa nas médias de escore fecal, em função da adição de EPL na dieta. A distribuição percentual por tratamento está apresentada na Tabela 28.

TABELA 28 Distribuição percentual do escore fecal das amostras obtidas dos gatos, em função dos teores de EPL na dieta

<b>Escores</b>	<b>Controle</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>
1	0	0	0	0
2	5	11	17	10
3	60	47	61	55
4	10	37	22	30
5	25	5	0	5
Total	100	100	100	100

Os resultados semelhantes para escore fecal podem ter ocorrido em função da melhor digestibilidade e cerca de 55% das fezes foram classificadas como escore 3, que são definidas como macias e bem formadas e que estão dentro dos parâmetros esperados. Middelbos et al. (2007), ao avaliarem a influência de parede de levedura em dietas para cães, não encontraram diferenças significativas da inclusão do aditivo sobre a qualidade das fezes.

## 5 CONCLUSÃO

Os níveis utilizados nas condições do presente estudo permitem constatar a efetividade do uso de extrato seco de parede de levedura para felinos sobre a digestibilidade da matéria seca e um ligeiro potencial para redução de odor de fezes em dietas secas. Um efeito pró-inflamatório com o nível de 0,6% em dietas úmidas também pode ser observado, mas pesquisas subsequentes são importantes para estudar as possíveis causas e a repetibilidade desse achado. Metodologias alternativas para a mensuração de gás, a espessura de parede intestinal e a coleta de amostras são promissoras na pesquisa em nutrição de pequenos animais pela característica pouco invasiva, embora ajustes ainda sejam recomendados. De qualquer forma, novos estudos são necessários para a confirmação de efeitos, mecanismos de ação e de doses ideais desse aditivo para felinos domésticos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLSTRØM, O.; SKREDE, A. Comparative nutrient digestibility in dogs, blue foxes, mink and rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.128, n.21, p.2676S-2677S, 1998.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43p.

ANGELOTTI, R.; HALL, H.E.; FOTER, M.J.; LEWIS, K.H. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. **Applied & Environmental Microbiology**, Oxford, v.10, n.3, p.193-199, 1962.

APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.50, n.2, p.197-263, 1998.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **AAFCO official publication**. Atlanta, 2007. 512p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington, 1995. 1018p.

BACKUS, R.C.; PURYEAR, L.M.; CROUSE, B.A.; BOURGE, V.C.; ROGERS, Q.R. Breath hydrogen concentrations of cats given commercial canned and extruded diets indicate gastrointestinal microbial activity vary with diet type. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.132, n.6, p.1763-1766, 2002. Supplement.

BARTOSHUK, L.M.; JACOBS, H.L.; NICHOLS, T.L.; HOFF, L.A.; RYCKMAN, J.J. Taste rejection of nonnutritive sweeteners in cats. **Journal of Comparative Physiology & Psychology**, New York, v.89, n.8, p.971-975, 1975.

BAURHOO, B.; LETELLIER, A.; ZHAO, X.; RUIZ-FERIA, C.A. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and *Escherichia coli* populations after in vivo *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**, Champaign, v.86, n.12, p.2509-2516, 2007.

BELENGUER, A.; DUNCAN, S.H.; CALDER, G.; HOLTROP, G.; LOUIS, P.; LOBLEY, G.E.; FLINT, H.J. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.5, p.3593-3599, 2006.

BILLER, D.S.; PARTINGTON, B.P.; MIYABAYIASHI, T.; LEVEILLE, R. Ultrasonographic appearance of the chronic hypertrophic pyloric gastropathy in the dog. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v.35, n.1, p.30-33, 1994.

BLUMENSTOCK, E.; JANN, K. Adhesion of piliated escherichia coli strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pili and those with mannose-resistant pili. **Infection and Immunity**, Washington, v.35, n.1, p.264-269, 1982.

BOARI, C.A. Gestão da qualidade no processo produtivo de alimentos para cães e gatos. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE CÃES E GATOS, 3., 2007, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007. p.67-80.

BORGES, F.M.; SALGARELLO, R.M.; GURIAN, T.M. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - COLÉGIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 3., 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. p.21-60.

BOURRIAUD, C.; ROBINS, R.J.; MARTIN, L.; KOZLOWSKI, F.; TENAILLEAU, E.; CHERBUT, C.; MICHEL, C. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microbiotas but inter-individual variation is evident. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.99, n.1, p.201-212, 2005.

BRADSHAW, J.W.; GOODWIN, D.; LEGRAND-DEFRETIN, V.; NOTT, H.M.R. Food selection by the domestic cat, an obligate carnivore. **Comparative and Biochemistry Physiology**, New York, v.114A, n.3, p.205-209, 1996.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C.; MIUKI, C.J. Importância da microbiota intestinal. **Pediatria**, São Paulo, v.28, n.2, p.117-127, 2006.

BRASIL. Portaria ANVISA nº 518, de 25 março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n.59, p.266-270, 26 mar. 2004. Sessão I.

BROSEY, P.B.; HILL, R.C.; SCOTT, K.C. Gastrointestinal volatile fatty acid concentrations and pH in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.61, n.4, p.359-361, 2000.

CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.D. Arroz ou sorgo: qual o melhor amido para cães e gatos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 4., 2004, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: CBNA, 2004. p.83-106.

CARCIOFI, A.C.; OLIVEIRA, L.D.; VASCONSELLOS, R.S. **III curso teórico-prático sobre nutrição de cães e gatos: uma visão industrial**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 50p. Apostila.

CARNEIRO, L.C. Avaliação de *Escherichia coli* em manipuladores de alimentos da cidade de Morrinhos – GO. **Vita et Sanitas**, Trindade, v.2, n.2, p.31-42, 2008.

CASE, L.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A **Nutrição canina e felina: manual para profissionais**. Madri: Hartcourt Brace, 1998. 424p.

CASTILLO, M.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; TAYLOR-PICKARD, J.F.; PÉREZ, J.F.; GASA, J. Use of mannan-oligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, n.1, p.94-101, 2008.

CHAUD, S.G.; SGARBIERI, V.C.; VICENTE, E.; SILVA, N.; ALVES, A.B.; MATTOS, J.A.R. Influência de frações da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre os índices séricos de glicose e lipídios, microbiota intestinal e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) de ratos em crescimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.338-348, 2007.

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, Amsterdam, v.591, n.1/2, p.276-289, 2005.

DAYOT, R.; VILARI, F.; LACEY, G. Improving the quality of color colonoscopy videos. **EURASIP Journal on Image & Video Processing**, New York, 2008. Doi: 10.1155/2008/139429. Disponível em: <www.hindawi.com>. Acesso em: 10 dez. 2008.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.73, n.6, p.1131S-1141S, 2001.

DUNCAN, M.J.; MANN, E.L.; COHEN, M.S.; OFEK, I.; SHARON, N.; ABRAHAM, S.N. The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.280, n.45, p.37707-37716, 2005.

DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; FLINT, H.J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.10, p.5810-5817, 2004.

EDWARDS, R.A.; PUENTE, J.L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.6, n.7, p.282-287, 1998.

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**, Champaign, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

FELICIANO, M.A.R. **Suplementação de probióticos para filhotes cães da raça Beagles recebendo alimentos comerciais**. 2008. 105p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FERKET, P.R.; PARKS, C.W.; GRIMES, J.L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. In: MULTI-STATE POULTRY FEEDING AND NUTRITION CONFERENCE, 16., 2002, Indianapolis. **Proceedings**... Indianapolis: University of Illinois, 2002. p.22.

FERNANDES, P.C.C.; SILVA, A.V.; RODRIGUEZ, N.M.; FERREIRA, C.L.L.F. **Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de cães**. Disponível em: <[http://www.adip.com.br/ftp/Viabilidade\\_do\\_uso\\_de\\_probioticos.pdf](http://www.adip.com.br/ftp/Viabilidade_do_uso_de_probioticos.pdf)>. Acesso em: 12 nov. 2008.

FIERI, W.J.; LEVADA, M.M.O.; PIVESSO, M.S.G. **Apontamentos teóricos de citologia, histologia e embriologia**. São Paulo: Catálise, 1997. 416p.

FINNIE, I.A.; DWARAKANATH, A.D.; TAYLOR, B.A.; RHODES, M. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. **Gut**, London, v.36, n.1, p.93-99, 1995.

FINUCANE, M.; SPRING, P.; NEWMAN, K. Incidence of mannose-sensitive adhesins in enteric bacteria. **Poultry Science**, Champaign, v.78, n.1, p.139, 1999. Abstract.

GAASTRA, W.; GRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic escherichia coli strains. **Microbiological Reviews**, Washington, v.46, n.2, p.129-161, 1982.

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

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J. van; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.17, n.2, p.259-275, 2004.

GOMES, A.M. **Isolamento e tipificação genotípica de *Clostridium perfringens* em frangos de corte**. 2007. 27p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GOUVEIA, E.M.F.; SILVA, I.S.; ONSELEM, V.J. van; CORREA, R.A.C.; SILVA, C.J. Use of mannanoligosacharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and this effects on *E.coli* inactivated in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.4, p.23-26, 2006. Supplemment.

GRIESHOP, C.M. Diet may affect nutrition, immune system of pets. **Feedstuffs**, Minnetonka, v.75, n.26, p.1-5, 2003.

GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BRUCE, K.J.; PATIL, A.R.; CZARNECKI-MAULDEN, G.L.; FAHEY, G.C. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v.58, n.6, p.483-493, 2004.

HESTA, M.; ROOSEN, W.; JANSSENS, G.P.J.; MILLET, S.; WILDE, R. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.90, n.6, p.1007-1014, 2003.

HOLT, J.G.; BERGY, D.H.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787p.

IQBAL, J.; ZAIDI, M. Molecular regulation of mechanotransduction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.328, n.3, p.751-755, 2005.

JANN, K.; SCHMIDT, G.; BLUMENSTOCK, E.; VOSBECK, K. Escherichia coli adhesion to *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells: role of piliation and surface hydrophobicity. **Infection and Immunity**, Washington, v.32, n.3, p.484-489, 1981.

JOBIM, C.C.; GONÇALVES, G.D.; SANTOS, G.T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá, PR. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. p.242-261.

KAPRELYANTS, A.S.; KELL, D.B. Do bacteria need to communicate with each other for growth? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.4, n.6, p.237-241, 1996.

KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.26, n.3, p.239-256, 2002.

KOIDE, A.; YAMAGUCHI, T.; ODAKA, T. Quantitative analyses of bowel gas using plain abdominal radiograph in patients with irritable bowel syndrome. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v.95, n.7, p.1735-1741, 2000.

LEE, K.; LIM, C.Y.; TENG, W.L.; OUWEHAND, A.C.; TUOMOLA, E.M.; SALMINEN, S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.9, p.3692-3697, 2000.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.70, n.2, p.317-343, 2006.

LEVINE, M. The effect of concentration of dyes on differentiation of enteric bacteria on eosin-methylene-blue ágar. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.45, n.5, p.471-475, 1943.

LI, X.; LI, W.; WANG, H.; CAO, J.; MAHASHI, K.; HUANG, L.; BACHMANOV, A.A.; REED, D.R.; LEGRAND-DEFRETIN, V.; BEAUCHAMP, G.K.; BRAND, J. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. **Plos Genetics**, San Francisco, v.1, n.1, p.27-35, 2005.

LIMA, L.M.S. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para gatos adultos**. 2008. 87p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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**, Oxford, v.102, n.5, p.1197-1208, 2007.

LOUVARD, D.; KEDINGER, M.; HAURI, H.P. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. **Annual Reviews of Cell Biology**, Palo Alto, v.8, n.1, p.157-195, 1992.

LOWE, J.A.; KERSHAW, S.J. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. **Research in Veterinary Science**, London, v.63, n.1, p.61-66, 1997.

LU, L.; WALKER, A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.73, n.6, p.1124S-1130S, 2001.

LUBBS, D.C.; VESTER, B.M.; FASTINGER, N.D.; SWANSON, K.S. 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. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.93, n.1, p.113-121, 2008.

LUSSIER, C.; BASORA, N.; BOUATROUSS, Y.; BEAULIEU, J.F. Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. **Microscopy Research and Technique**, New York, v.51, n.2, p.169-178, 2000.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal Tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.69, n.5, p.1033-1045, 1999. Supplement.

MADSEN, K.; CORNISH, A.; SOPER, P.; MCKAIGNEY, C.; JIJON, H.; YACHIMEC, C.; DOYLE, J.; JEWELL, L.; SIMONE, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.121, n.3, p.580-591, 2001.

MAIA, G.V.C. **Zeólitas (Clinoptilolita) e *Yucca schidigera* em rações para cães**: palatabilidade, digestibilidade e redução de odores fecais. 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MAIORKA, A. **Qualidade intestinal em frangos**. Disponível em: <<http://www.mercolab.com.br/artigos/AlexMaiorka-QualidadeIntestinal.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2008.

MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.23, n.1, p.130-135, 1960.

MANDIGAN, M.T.; MARTINKO, M.T.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608p.

MIDDELBOS, I.S.; GODOY, M.R.; FASTINGER, N.D.; FAHEY JUNIOR, G.C. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85, n.11, p.3022-3032, 2007.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.3, n.10, p.371-394, 1949.

MOYAERT, H.; GRAEF, E.M.; HAESBROUCK, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Science**, London, v.81, n.1, p.1-7, 2006.

NATIONAL RESEARCH .COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington : National Academy of Science, 2006. 398p.

NASCIMENTO, D.B.D.; JUNQUEIRA, K.; NASCIMENTO, J.E.A. Rapid restoration of colonic goblet cells induced by a hydrolyzed diet containing probiotics in experimental malnutrition. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.22, n.1, p.72-76, 2007.

NEIDHARDT, F.C.; BLOCH, P.L.; SMITH, D.F. Culture medium for enterobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.119, n.3, p.736-747, 1974.

NEWELL, S.M.; GRAHAM, J.P.; ROBERTS, G.D.; GINN, P.E.; HARRISON, J.M. Sonography of the normal feline gastrointestinal tract. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v.40, n.1, p.40-43, 1999.

NUMAJIRI, L.N. **Valores nutricionais de alimentos completos e equações de predição de energia metabolizável para gatos adultos**. 2006. 85p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OFEK, I.; BEACHEY, E.H. Mannose binding and epithelial cell Adherence of *Escherichia coli*. **Infection & Immunity**, Washington, v.22, n.1, p.247-254, 1978.

OLIVEIRA, M.C.; CANCHERINI, L.C.; GRAVENA, R.A.; RIZZO, P.V.; MORAES, V.M.B. Utilização de nutrientes de dietas contendo mananoligossacarídeo e/ou complexo enzimático para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, n.4, p.825-831, 2007.

OUWEHAND, A.C.; NIEMI, P.; SALMINEN, P.N.; SEPPO, S.J. The normal faecal microbiota does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.177, n.1, p.35-38, 1999.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n.547, p.125-134, 2003.

RASTALL, R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.34, n.8, p.2022S-2026S, 2004.

RINKINEN, M.; MATTO, J.; SALMINEN, S.; WESTERMARCK, E.; OUWEHAND, A.C. In vitro adhesion of lactic acid bacteria to canine small intestinal mucus. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.84, n.1/2, p.43-47, 2000.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. Verion 9.1.1. Cary, 2004. Software.

SCHEPPACH, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, London, v.35, n.1, p.35-38, 1994. Supplement.

SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDIN, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Techonology**, Campinas, v.2, n.1/2, p.129-125, 1999.

SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.17, n.2, p.48-55, 2006.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. In: \_\_\_\_\_. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. p.39-45.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2001. 295p.

SIMS, M.D.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E.; SPRING, P.; HOOGE, D.M. Effects of dietary mannan oligosaccharide, bacitracin methylene disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v.83, n.7, p.1148-1154, 2004.

SINGH, B.; HALESTRAP, A.P.; PARASKEVAL, C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. **Carcinogenesis**, Oxford, v.18, n.6, p.1265-1270, 1997.

SMIRICKY-TJARDES, M.R.; FLICKINGER, E.A.; GRIESHOP, C.M.; BAUER, L.L.; MURPHY, M.R.; FAHEY JUNIOR, G.C. In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microbiota. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n.10, p.2505-2514, 2003.

SMITS, G.J.; KAPTEYN, J.C.; ENDE, H. van de; KLIS, F.M. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.2, n.4, p.348-352, 1999.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN, K.E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.79, n.2, p.205-211, 2000.

STEINHARDT JUNIOR, R.G.; CALVIN, A.D.; DODD, E.A. Taste-structure correlation with -D-Mannose and -D-Mannose. **Science**, New York, v.135, n.3501, p.367-368, 1962.

STEWART, R.A.; CARRICO, C.K.; WEBSTER, R.L.; STEINHARDT, R.G. Physicochemical stereospecificity in taste perception of alpha-D-Mannose and beta-D-Mannose. **Nature**, London, v.234, n.5326, p.220, 1971. Abstract.

STURGESS, C.P.; CANFIELD, P.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; STOKES, C.R. A gross and microscopical morphometric evaluation of feline large intestinal anatomy. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.124, n.4, p.255-264, 2001.

SWANSON, K.; FAHEY JUNIOR, G.C. Prebiotics in companion animal nutrition. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2002. p.461-473.

SWANSON, K.S.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; HEALY, H.P.; DAWSON, K.A.; MERCHEN, N.R.; FAHEY JUNIOR, G.C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrients digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.132, n.5, p.980-989, 2002.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856p.

TABUCHI, Y.; ARAI, Y.; KONDO, T.; TAKEGUSHI, N.; ASANO, S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.293, n.4, p.1287-1294, 2002.

TAKEICHI, M. Morphometric roles of classic cadherins. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.7, n.5, p.619-627, 1995.

TELLEZ, G.; HIGGINS, S.E.; DONOGHUE, A.M.; HARGIS, B.M. Digestive physiology and the role of microorganisms **Journal Applied Poultry Research**, Athens, v.15, n.1, p.136-144, 2006.

THOMAS, W.E.; TRINTCHINA, E.; FORERO, M.; VOGEL, V.; SOKURENKO, E.V. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. **Cell**, Cambridge, v.109, n.7, p.913-923, 2002.

TOPPING, D.L.; CLIFTON, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.81, n.3, p.1031-1064, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

TRINDADE, A.B.; BRUN, M.V.; BASSO, P.C.; PÖLH, V.H.; MACHADO, V.O.; BORTOLINI, C.E.; SOSO, A.B.; FRANÇA, R.T.; CONTESINI, E.A. Intervalos de tempo entre enema e colonoscopia rígida no preparo intestinal com solução monobásica e dibásica de sódio em quatro cães. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v.36, n.2, p.161-165, 2008.

TUOMOLA, E.M.; OWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.26, n.2, p.137-142, 1999.

TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, Elmsford, v.40, n.7, p.423-429, 2003.

UTIYAMA, C.E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões desmamados**. 2004. 94p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **The essentials of glycobiology**. Califórnia: CHLS, 1999. 653p.

VICKERS, R.J.; SUNVOLD, G.D.; KELLEY, R.L.; REINHART, G.A. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microbiota. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, n.4, p.609-615, 2001.

WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.9, n.12, p.668-675, 1998.

WHITE, L.A.; NEWMAN, M.C.; CROMWELL, G.L.; LINDEMANN, M.D. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, n.10, p.2619-2628, 2002.

WILSON, A.J.; GIBSON, P.R. Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. **Clinical Science**, London, v.93, n.2, p.97-108, 1997.

WOLFE, A.J. The acetate switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.69, n.1, p.12-50, 2005.

WYNNE, E.S.; RODE, L.J.; HAYWARD, A.E. Mechanism of the selective action of eosin-methylene-blue ágar on the enteric. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v.17, n.1, p.11-20, 1942.

XAFRANSKI, H.; REITER, M.G.R. **Resultados parciais da verificação de bactérias probióticas em leite materno proveniente de banco de leite humano**. Disponível em:  
<[http://www.furb.br/formularios/aleitamento/anais/gqb/art\\_gqb\\_01.pdf](http://www.furb.br/formularios/aleitamento/anais/gqb/art_gqb_01.pdf)>.  
Acesso em: 12 nov. 2008.

YANG, Y.; IJI, P.A.; KOCHER, A.; MIKKELSEN, L.L.; CHOCT, M. Effects of mannanoligosaccharide on growth performance, the development of gut microflora, and gut function of broiler chickens raised on new litter. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v.16, n.2, p.280-288, 2007.

ZAMZE, S.; MARTINEZ-POMARES, L.; JONES, H.; TAYLOR, P.R.; STILLION, R.J.; GORDON, S.; WONG, S.Y.C. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.277, n.44, p.41613-41623, 2002.

ZDUNCZYK, Z.; JUSKIEWICZ, J.; JANKOWSKI, J.; BIEDRZYCKA, E.; KONCICKI, A. Metabolic response of the gastrointestinal tract of turkeys to diets with different levels of mannan-oligosaccharide. **Poultry Science**, Champaign, v.84, n.6, p.903-909, 2005.

ZENTEK, J.; FRICKE, S.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; EHINGER, B.; AMTSBERG, G.; BAUMS, C. Dietary protein source and manufacturing processes affect macronutrient digestibility, fecal consistency, and presence of fecal *Clostridium perfringens* in adult dogs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.134, n.8, p.2158S-2161S, 2004.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.134, n.6, p.1682S-1684S, 2002.

ZLOTNIK, H.; FERNANDEZ, M.P.; BOWERS, B.; CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.159, n.3, p.1018-1026, 1984.

## ANEXOS

TABELA 1A	Análise de variância e coeficiente de variação para pH no experimento 1.....	155
TABELA 2A	Análise de variância e coeficiente de variação para o número de bactérias lácticas (log UFC/g) no experimento 1.....	155
TABELA 3A	Análise de variância e coeficiente de variação para o número de clostridio sulfito redutor (log UFC/g) no experimento 1.....	155
TABELA 4A	Análise de variância e coeficiente de variação para relação bactérias lácticas/clostridio sulfito redutor no experimento 1.....	156
TABELA 5A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria seca (g/dia) no experimento 1.....	156
TABELA 6A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de proteína bruta (g/dia) no experimento 1.....	156
TABELA 7A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de extrato etéreo (g/dia) no experimento 1.....	157
TABELA 8A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria mineral (g/dia) no experimento 1.....	157
TABELA 9A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria orgânica (g/dia) no experimento 1.....	157
TABELA 10A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de energia bruta (kcal/dia) no experimento 1.....	158
TABELA 11A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (%) no experimento 1.....	158

TABELA 12A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (%)* no experimento 1.....	158
TABELA 13A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo (%) no experimento 1.....	159
TABELA 14A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria mineral* (%) no experimento 1.....	159
TABELA 15A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria orgânica (%) no experimento 1.....	159
TABELA 16A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta (%) no experimento 1.....	160
TABELA 17A	Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria seca (kcal/kg) no experimento 1.....	160
TABELA 18A	Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria natural (kcal/kg) no experimento 1.....	160
TABELA 19A	Teste de Kruskal Wallis para escore fecal no experimento 1.....	161
TABELA 20A	Teste de Kruskal-Wallis para o escore de alterações em mucosa (colonoscopia) no experimento 1.....	161
TABELA 21A	Análise de variância e coeficiente de variação para o número de colonócitos no experimento 1. ....	161

TABELA 22A	Análise de variância e coeficiente de variação para o número de caliciformes no experimento 1.....	162
TABELA 23A	Análise de variância e coeficiente de variação para relação colonócitos/caliciforme no experimento 1.....	162
TABELA 24A	Análise de variância e coeficiente de variação para a espessura de parede intestinal (mm) no experimento 1.....	162
TABELA 25A	Teste de Kruskal-Wallis para área de gás (cm <sup>2</sup> ) no experimento 1.....	163
TABELA 26A	Teste de Kruskal-Wallis para escore de gás no experimento 1.....	163
TABELA 27A	Análise de variância para o consumo na matéria natural (g/dia) no experimento 2.....	163
TABELA 28A	Análise de variância para o consumo na matéria seca (g/dia) no experimento 2.....	164
TABELA 29A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de bactérias lácticas (log UFC/g) no experimento 3.....	164
TABELA 30A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de enterobactérias (log UFC/g) no experimento 3.....	164
TABELA 31A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de <i>E. coli</i> (log UFC/g) no experimento 3.....	165
TABELA 32A	Análise de variância e coeficiente de variação para a relação de bactérias lácticas/ <i>E. coli</i> (log UFC/g) no experimento 3.....	165
TABELA 33A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (μmol/g de MS) no experimento 3.....	165

TABELA 34A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de ácido acético ( $\mu\text{mol/g}$ de MS) no experimento 3.....	166
TABELA 35A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de ácido propiônico ( $\mu\text{mol/g}$ de MS) no experimento 3.....	166
TABELA 36A	Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de ácido butírico ( $\mu\text{mol/g}$ de MS) no experimento 3.....	166
TABELA 37A	Teste de Kruskal Wallis para o nitrogênio amoniacal ( $\text{mg}\%$ ) no experimento 3.....	167
TABELA 38A	Teste de Kruskal Wallis para o escore de odor de fezes no experimento 3.....	167
TABELA 39A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria seca no experimento 4.....	167
TABELA 40A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de proteína bruta no experimento 4. ....	168
TABELA 41A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria mineral no experimento 4. ....	168
TABELA 42A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria mineral no experimento 4. ....	168
TABELA 43A	Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de energia bruta no experimento 4.....	169
TABELA 44A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca ( $\%$ ) no experimento 4.....	169

TABELA 45A	Análise de variância e coeficiente de variação o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (%) no experimento 4.....	169
TABELA 46A	Análise de variância e coeficiente de variação para a matéria mineral (%) no experimento 4.....	170
TABELA 47A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria orgânica (%) no experimento 4.....	170
TABELA 48A	Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta (%) no experimento 4.....	170
TABELA 49A	Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria seca (kcal/kg) no experimento 4.....	171
TABELA 50A	Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria natural (kcal/kg) no experimento 4.....	171
TABELA 51A	Teste de Kruskal Wallis para escore fecal no experimento 4.....	171

TABELA 1A Análise de variância e coeficiente de variação para pH no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,00084100	0,00084100	0,04	0,8362
Quadrático	1	0,00684500	0,00684500	0,36	0,5572
Desvio	1	0,03920400	0,03920400	2,06	0,1706
Resíduo	16	0,30469000	0,01904313		
CV (%)	2,12				

TABELA 2A Análise de variância e coeficiente de variação para o número de bactérias lácticas (log UFC/g) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,03276100	0,03276100	0,11	0,7493
Quadrático	1	0,00220500	0,00220500	0,01	0,9338
Desvio	1	0,02788900	0,02788900	0,09	0,7680
Resíduo	16	4,95724000	0,0982750		
CV (%)	4,38				

TABELA 3A Análise de variância e coeficiente de variação para o número de clostridio sulfito redutor (log UFC/g) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,20672222	0,20672222	1,25	0,2812
Quadrático	1	0,01957765	0,01957765	0,12	0,7356
Desvio	1	0,23609551	0,23609551	1,43	0,2508
Resíduo	16	2,48126000	0,16541733		
CV (%)	6,56				

TABELA 4A Análise de variância e coeficiente de variação para a relação bactérias lácticas/clostridio sulfito redutor no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,01142732	0,01142732	0,48	0,4985
Quadrático	1	0,00128310	0,00128310	0,05	0,8193
Desvio	1	0,02734387	0,02734387	1,15	0,3002
Resíduo	16	0,35625478	0,02375032		
CV (%)	7,75				

TABELA 5A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria seca (g/dia) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	145,6280507	145,6280507	1,58	0,2286
Quadrático	1	159,2443672	159,2443672	1,72	0,2090
Desvio	1	19,9675865	19,9675865	0,22	0,6487
Resíduo	15	1386,255166	92,417011		
CV (%)	23,24				

TABELA 6A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de proteína bruta (g/dia) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	28,65219014	28,65219014	1,58	0,2283
Quadrático	1	25,36261511	25,36261511	1,40	0,2557
Desvio	1	10,40094619	10,40094619	0,57	0,4609
Resíduo	15	272,3870743	18,1591383		
CV (%)	23,34				

TABELA 7A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de extrato etéreo (g/dia) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	10,34401389	10,34401389	2,17	0,1611
Quadrático	1	5,98149807	5,98149807	1,26	0,2799
Desvio	1	0,15079416	0,15079416	0,03	0,8611
Resíduo	15	71,38759056	4,75917270		
CV (%)	23,14				

TABELA 8A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria mineral (g/dia) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	3,11435858	3,11435858	2,61	0,1271
Quadrático	1	1,80262513	1,80262513	1,51	0,2380
Desvio	1	0,99305723	0,99305723	0,83	0,3761
Resíduo	15	17,90449278	1,19363285		
CV (%)	24,38				

TABELA 9A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria orgânica (g/dia) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	106,1452812	106,1452812	1,46	0,2454
Quadrático	1	127,1716190	127,1716190	1,75	0,2055
Desvio	1	12,0588156	12,0588156	0,17	0,6894
Resíduo	15	1089,250904	72,616727		
CV (%)	23,12				

TABELA 10A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de energia bruta (kcal/dia) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	5479,564123	5479,564123	1,83	0,1965
Quadrático	1	6141,944186	6141,944186	2,05	0,1729
Desvio	1	1032,233557	1032,233557	0,34	0,5662
Resíduo	15	44990,21652	2999,34777		
CV (%)	23,75				

TABELA 11A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (%) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob>F
Linear	1	53,85032691	53,85032691	3,98	0,0646
Quadrático	1	30,312677765	30,312677765	2,24	0,1553
Desvio	1	1,43159011	1,43159011	0,11	0,7496
Resíduo	15	203,0613600	13,5374240		
CV (%)	5,15				

TABELA 12A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (%)\* no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,12198389	0,12198389	3,47	0,0822
Quadrático	1	0,07628602	0,07628602	2,17	0,1614
Desvio	1	0,04926289	0,04926289	1,40	0,2549
Resíduo	15	0,52436161	0,03515744		
CV (%)	2,32				

\* Transformado por raiz

TABELA 13A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo (%) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	13,37702722	13,37702722	0,30	0,5897
Quadrático	1	9,89752971	9,89752971	0,22	0,6424
Desvio	1	1,21109264	1,21109264	0,03	0,8705
Resíduo	15	660,9090750	44,0606050		
CV (%)	7,52				

TABELA 14A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria mineral\* (%) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	1,69068575	1,69068575	2,15	0,1683
Quadrático	1	0,45427072	0,45427072	0,58	0,4620
Desvio	1	0,13714557	0,13714557	0,17	0,6836
Resíduo	12	9,43932582	0,78661048		
CV (%)	12,91				

\* Transformação por raiz

TABELA 15A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria orgânica (%) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	1,01760067	1,01760067	0,11	0,7434
Quadrático	1	23,332003225	23,332003225	2,57	0,1347
Desvio	1	3,04079439	3,04079439	0,34	0,5733
Resíduo	12	108,8321617	9,0693468		
CV (%)	3,72				

TABELA 16A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta (%) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	34,76005556	34,76005556	3,76	0,0717
Quadrático	1	9,76489529	9,76489529	1,06	0,3206
Desvio	1	2,15258989	2,15258989	0,23	0,6365
Resíduo	15	138,8018600	9,2534573		
CV (%)	3,93				

TABELA 17A Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria seca (kcal/kg) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	42115,80247	42115,80247	1,14	0,2528
Quadrático	1	98260,00000	98260,00000	3,30	0,0893
Desvio	1	47344,04494	47344,04494	1,59	0,2266
Resíduo	15	446700,0000	29780,0000		
CV (%)	4,03				

TABELA 18A Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria natural (kcal/kg) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	2064,963580	2064,963580	1,43	0,2497
Quadrático	1	5039,650000	5039,650000	3,50	0,0810
Desvio	1	2262,948876	2262,948876	1,57	0,2292
Resíduo	15	21604,75000	1440,31667		
CV (%)	4,04				

TABELA 19A Teste de Kruskal Wallis para escore fecal no experimento 1.

Tratamentos	Soma de escore	Esperado Sob $H_0$	Desvio padrão sob $H_0$	Média de escore
0,0	1188,50	1323,0	112,977851	44,018519
0,2	1611,00	1372,0	114,226263	57,535714
0,4	879,50	980,0	101,981822	43,975000
0,6	1074,00	1078,0	105,561215	48,818182
Qui-quadrado	4,9090			
P	0,1786			

TABELA 20A Teste de Kruskal-Wallis para o escore de alterações em mucosa (colonoscopia) no experimento 1.

Tratamentos	Soma de escore	Esperado sob $H_0$	Desvio padrão sob $H_0$	Média de escore
0,0	40,0	52,50	10,032841	8,00
0,2	40,0	52,50	10,032841	8,00
0,4	44,0	52,50	10,032841	8,80
0,6	86,0	52,50	10,032841	17,20
Qui-quadrado	11,2286			
P	0,0106			

TABELA 21A Análise de variância e coeficiente de variação para o número de colonócitos no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	10396,14596	10396,14596	2,70	0,1243
Quadrático	1	1088,02368	1088,02368	0,28	0,6040
Desvio	1	1093,91264	1093,91264	0,28	0,6030
Resíduo	13	50059,45000	3850,72692		
CV (%)	11,81				

TABELA 22A Análise de variância e coeficiente de variação para o número de caliciformes no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,51512141	0,51512141	0,06	0,8067
Quadrático	1	0,00827521	0,00827521	0,00	0,9752
Desvio	1	61,39467634	61,39467634	7,43	0,0173
Resíduo	13	107,4298440	8,2638342		
CV (%)	39,61				

\* Variável transformada por raiz.  $R^2 = 0,3660$

TABELA 23A Análise de variância e coeficiente de variação para a relação colonócitos/caliciforme no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,00051377	0,00051377	0,12	0,7323
Quadrático	1	0,00001114	0,00001114	0,00	0,9597
Desvio	1	0,03002240	0,03002240	7,14	0,0192
Resíduo	13	0,05467994	0,08507474		
CV (%)	66,44				

\* Variável transformada por raiz.  $R^2 = 0,3572$

TABELA 24A Análise de variância e coeficiente de variação para a espessura de parede intestinal (mm) no experimento 1.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,00012475	0,00012475	0,01	0,9224
Quadrático	1	0,02671906	0,02671906	2,10	0,1670
Desvio	1	0,00579904	0,00579904	0,45	0,5096
Resíduo	16	0,20395157	0,0127467		
CV (%)	13,44				

\* Transformada por logaritmo

TABELA 25A Teste de Kruskal-Wallis para área de gás (cm<sup>2</sup>) no experimento 1.

Tratamentos	Soma de escore	Esperado sob H0	Desvio padrão sob H0	Média de escore
0,0	57,0	52,50	11,456439	11,40
0,2	56,0	52,50	11,456439	11,20
0,4	57,0	52,50	11,456439	11,40
0,6	40,0	52,50	11,456439	8,00
Qui-quadrado	1,1943			
P	0,7544			

TABELA 26A Teste de Kruskal-Wallis para escore de gás no experimento 1

Tratamentos	Soma de escore	Esperado sob H0	Desvio padrão sob H0	Média de escore
0,0	47,50	52,50	10,804787	9,50
0,2	67,50	52,50	10,804787	13,50
0,4	61,00	52,50	10,804787	12,20
0,6	34,00	52,50	10,804787	6,80
Qui-quadrado	4,2690			
P	0,2338			

TABELA 27A Análise de variância para o consumo na matéria natural (g/dia) no experimento 2.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Dia	5	34498,32500	6899,66500	9,94	0,0018
Trat	1	57,294,78017	57,294,78017	1,20	0,3116
Alimento*Dia	5	31891,51333	6378,30267	1,11	0,3578

TABELA 28A Análise de variância para o consumo na matéria seca (g/dia) no experimento 2.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Dia	5	1021,409459	204,281892	8,31	0,0043
Trat	1	2159,940000	2159,940000	0,79	0,5609
Alimento*Dia	5	1639,341552	327,868310	1,26	0,2817

TABELA 29A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de bactérias lácticas (log UFC/g) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,08940100	0,08940100	0,05	0,8196
Quadrático	1	0,33024500	0,33024500	0,20	0,6619
Desvio	1	2,14036900	2,14036900	1,29	0,2734
Resíduo	16	26,61384000	1,66336500		
CV (%)	15,07				

TABELA 30A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de enterobactérias (log UFC/g) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,50410000	0,50410000	0,62	0,4408
Quadrático	1	0,06272000	0,06272000	0,08	0,7840
Desvio	1	1,41610000	1,41610000	1,76	0,2038
Resíduo	16	12,90960000	0,80685000		
CV (%)	14,56				

TABELA 31A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de *E. coli* (log UFC/g) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,29363339	0,29363339	0,43	0,5224
Quadrático	1	0,03620028	0,03620028	0,05	0,8211
Desvio	1	1,37392939	1,37392939	2,01	0,1777
Resíduo	16	9,54881500	0,68205821		
CV (%)	14,29				

TABELA 32A Análise de variância e coeficiente de variação para a relação de bactérias lácticas/*E. coli* (log UFC/g) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,00001253	0,00001253	0,00	0,9903
Quadrático	1	0,00018132	0,00018132	0,00	0,9630
Desvio	1	0,00080200	0,00080200	0,01	0,9224
Resíduo	16	1,14122314	0,08151594		
CV (%)	17,71				

TABELA 33A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta ( $\mu\text{mol/g}$  de MS) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,00205987	0,00205987	0,01	0,9100
Quadrático	1	0,10391716	0,10391716	0,56	0,4635
Desvio	1	0,08758714	0,08758714	0,48	0,5003
Resíduo	16	2,9720398	0,18420025		
CV (%)	6,90				

TABELA 34A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de ácido acético ( $\mu\text{mol/g}$  de MS) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,19407791	0,19407791	1,96	0,1828
Quadrático	1	0,39616435	0,39616435	4,01	0,0650
Desvio	1	0,01255884	0,01255884	0,13	0,7268
Resíduo	14	1,38310770	0,09879341		
CV (%)	6,18				

\* Transformada por logaritmo

TABELA 35A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de ácido propiônico ( $\mu\text{mol/g}$  de MS) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,00806459	0,00806459	0,03	0,8578
Quadrático	1	0,94187922	0,94187922	3,87	0,0667
Desvio	1	0,28623971	0,28623971	1,18	0,2941
Resíduo	16	3,89211908	0,24325744		
CV (%)	11,72				

\* Transformada por logaritmo

TABELA 36A Análise de variância e coeficiente de variação para a concentração de ácido butírico ( $\mu\text{mol/g}$  de MS) no experimento 3.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	0,22261865	0,22261865	0,33	0,5751
Quadrático	1	0,60635244	0,60635244	0,89	0,3590
Desvio	1	0,00664645	0,00664645	0,01	0,9225
Resíduo	16	10,875500012	0,67971876		
CV (%)	22,27				

\* Transformada por logaritmo

TABELA 37A Teste de Kruskal Wallis para o nitrogênio amoniacal (mg%) no experimento 3.

Tratamentos	Soma de escore	Esperado sob H0	Desvio padrão sob H0	Média de escore
0,0	48,00	52,50	11,443511	9,60
0,2	68,00	52,50	11,443511	13,60
0,4	39,50	52,50	11,443511	7,90
0,6	54,50	52,50	11,443511	10,90
Qui-quadrado	2,4827			
P	0,4784			

TABELA 38A Teste de Kruskal Wallis para o escore de odor de fezes no experimento 3.

Tratamentos	Soma de escore	Esperado sob H0	Desvio padrão sob H0	Média de escore
0,0	4615,50	5227,50	344,020244	90,500000
0,2	6248,00	5227,50	344,020244	122,509804
0,4	4967,00	5227,50	344,020244	97,392157
0,6	5079,50	5227,50	344,020244	99,598039
Qui-quadrado	9,5420			
P	0,0229			

TABELA 39A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria seca no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	15,237714	15,237714	0,01	0,9297
Quadrático	1	9420,742066	9420,742066	4,98	0,0414
Desvio	1	5435,770309	5435,770309	2,87	0,1108
Peso	1	10252,83151	10252,83151	5,42	0,0344
Resíduo	15	28391,81349	1892,78757		
CV (%)	24,43				

TABELA 40A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de proteína bruta no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	29,837888	29,837888	0,13	0,7282
Quadrático	1	1270,412357	1270,412357	5,34	0,0355
Desvio	1	952,007032	952,007032	4,00	0,0640
Peso	1	1303,025918	1303,025918	5,47	0,0335
Resíduo	15	3570,752402	238,050160		
CV (%)	24,85				

TABELA 41A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria mineral no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	1,10487469	1,10487469	0,11	0,7451
Quadrático	1	39,01588964	39,01588964	3,87	0,0679
Desvio	1	34,70706525	34,70706525	3,44	0,0832
Peso	1	54,59460520	54,59460520	5,42	0,0343
Resíduo	15	151,1397548	10,0759837		
CV (%)	24,02				

TABELA 42A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de matéria mineral no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	24,794741	24,794741	0,02	0,9034
Quadrático	1	8246,81379	8246,81379	5,07	0,0398
Desvio	1	4601,09329	4601,09329	2,83	0,1133
Peso	1	8811,17928	8811,17928	5,42	0,0344
Resíduo	15	28391,81349	1626,63378		
CV (%)	24,48				

TABELA 43A Análise de variância e coeficiente de variação para o consumo de energia bruta no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	410,0947	410,0947	0,01	0,9277
Quadrático	1	269163,1145	269163,1145	5,59	0,0319
Desvio	1	121817,8618	121817,8618	2,53	0,1325
Peso	1	261128,9452	261128,9452	5,43	0,0342
Resíduo	15	721961,224	48130,748		
CV (%)	24,54				

TABELA 44A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (%) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	34,035556	34,035556	4,654	0,0465
Quadrático	1	2,271380	2,271380	0,311	0,585
Desvio	1	18,939904	18,939904	2,590	0,127
Resíduo	16	117,005080	7,312817		
CV (%)	3,66				

TABELA 45A Análise de variância e coeficiente de variação o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (%) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	24,730729	24,730729	3,543	0,078
Quadrático	1	1,8060005	1,8060005	0,259	0,618
Desvio	1	5,285401	5,285401	0,757	0,397
Resíduo	16	111,679920			
CV (%)	3,38				

TABELA 46A Análise de variância e coeficiente de variação para a matéria mineral (%) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	93,16155769	93,16155769	0,86	0,3697
Quadrático	1	18,47640048	18,47640048	0,17	0,6860
Desvio	1	26,65645430	26,65645430	0,25	0,6277
Resíduo	14	1518,083827	108,434559		
CV (%)	32,00				

TABELA 47A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria orgânica (%) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	8,514724	8,514724	1,651	0,217
Quadrático	1	9,744080	9,744080	1,890	0,188
Desvio	1	26,357956	26,357956	5,112	0,038
Resíduo	16	82,498720	5,156170		
CV (%)	2,92				

TABELA 48A Análise de variância e coeficiente de variação para o coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta (%) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	16,8838100	16,8838100	5,02	0,0396
Quadrático	1	2,34612500	2,34612500	0,70	0,4158
Desvio	1	15,499996900	15,499996900	4,61	0,0474
Resíduo	16	53,78888000			
CV (%)	2,68				

TABELA 49A Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria seca (kcal/kg) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	42826,64692	42826,64692	4,99	0,0402
Quadrático	1	30298,44168	30298,44168	3,53	0,0787
Desvio	1	77460,909912	77460,909912	9,02	0,0084
Resíduo	16	137373,1543			
CV (%)	2,27				

TABELA 50A Análise de variância e coeficiente de variação para a energia digestível na matéria natural (kcal/kg) no experimento 4.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	Fc	Prob<F
Linear	1	37909,64762	37909,64762	5,20	0,0366
Quadrático	1	29356,18688	29356,18688	4,03	0,0619
Desvio	1	73762,21446	73762,21446	10,12	0,0058
Resíduo	16	116565,0039			
CV (%)	2,28				

TABELA 51A Teste de Kruskal Wallis para escore fecal no experimento 4.

Tratamentos	Soma de escore	Esperado sob $H_0$	Desvio padrão sob $H_0$	Média de escore
0,0	866,00	790,00	78,724091	43,300000
0,2	807,00	750,50	77,389398	42,473684
0,4	621,50	750,50	77,389398	32,710526
0,6	786,50	790,00	78,724091	39,325000
Qui-quadrado	3,1994			
P	0,3619			