



MATEUS PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM
SOLÚVEIS (DDGS) EM DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS**

**LAVRAS – MG
2024**

MATEUS PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) EM
DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Produção Animal, área de concentração em Nutrição de não ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Roberto Maciel de Oliveira
Orientador
Profa. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Mateus Pereira dos.

Avaliação do resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS)
em dieta para felinos domésticos / Mateus Pereira dos Santos. -
2023.

63 p.

Orientador(a): Roberto de Oliveira Maciel.

Coorientador(a): Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Gatos. 2. Micorbioma. 3. DDGS. I. Oliveira, Roberto Maciel
de. II. Saad, Flávia Maria de Oliveira Borges.

MATEUS PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) EM
DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS**

**EVALUATION OF DISTILLERS DRIED GRAINS WITH SOLUBLES (DDGS) IN DIET
FOR DOMESTIC FELINES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Produção Animal, área de concentração em Nutrição de não ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 26 de junho de 2023
Prof Dr. Roberto Maciel de Oliveira
Profa. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Profa. Dra. Vanessa Avelar Silva

Prof. Dr. Roberto Maciel de Oliveira
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por cuidar e guiar meus passos diariamente, me tranquilizando principalmente nos momentos mais críticos, durante meu período de mestrado.

Aos meus pais, Sonia e Valdemar, por sempre me apoiarem e incentivarem nos estudos ou qualquer decisão que eu julgasse ser importante para mim. Agradeço a minha irmã pelo apoio e incentivo nos momentos que precisei. Seria completamente difícil chegar até aqui sem o apoio que me deram.

À Universidade Federal de Lavras, o programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Produção Animal e o Departamento de Zootecnia pela execução do programa.

À PremierPet pelo financiamento do projeto.

À professora Flávia Saad pela orientação, amizade, todo o ensinamento e confiança no meu trabalho para que executasse um projeto de tamanha importância.

Ao professor Roberto pela orientação e todo ensino que passou, principalmente sobre a parte de microbiologia.

À professora Maria Godoy da Universidade de Illinois – EUA, por ter aceitado a parceria e realização das análises.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, das disciplinas as quais cursei durante o período de mestrado.

Aos meus colegas da Pós-graduação, em especial Lucas Daniel e Nathália Breder.

Ao pessoal do Núcleo de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia pela ajuda no manejo com os animais durante o período experimental. Aos animais que fizeram parte do estudo.

MUITO OBRIGADO!

"I put my armor on, show you how strong I am."
Sia

RESUMO GERAL

Objetivou-se avaliar a inclusão do resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS), com um nível de inclusão de 0 e 15%, quanto à digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, matéria mineral, aceitabilidade, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR), pH urinário, produção de fenol, indol, microbioma fecal e parâmetros redox para felinos domésticos. O experimento foi realizado no Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia do Departamento de Zootecnia da UFLA, por um período de 2 meses (janeiro-fevereiro de 2022). Foram utilizados 16 gatos adultos sem raça definida, machos e fêmeas, com peso de $4,16 \pm 0,26$, em delineamento inteiramente casualizado, oferecido a 8 animais, o alimento controle e, aos demais, o alimento teste. Os animais passaram por período de adaptação de 20 dias, durante o qual foi feito o teste de aceitabilidade. Após este período, foi realizada a coleta total de fezes durante 7 dias para análise de digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA). Foi aproveitada a coleta de digestibilidade para realizar as equações propostas por Matterson et al., (1965) e calcular os coeficientes de digestibilidade do ingrediente. Posteriormente a este período, iniciou-se a coleta de 3 dias de fezes para análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), cadeia ramificada (AGCR), fenol, indol e microbioma fecal. Ao final dos 60 dias, foi realizada coleta de sangue para avaliação de enzimas relacionadas ao status oxidativo (catalase, glutatona, taxa de peroxidação lipídica e superóxido dismutase). As variáveis dos coeficientes de digestibilidade, aceitabilidade e produtos de fermentação foram analisadas pelo Teste de Shapiro Wilk e ANOVA, e os parâmetros redox foram submetidos ao teste T, de forma não pareada, e as que não tiveram distribuição normal ao Teste Mann-Whitney, considerando probabilidade de 5%. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da MS, PB e EEHA, porém, ocorreu diferença ($p < 0,05$) para o CDA da MM e MO. Para os parâmetros redox, não houve diferença significativa para a maioria das enzimas avaliadas, exceto a catalase que apresentou tendência. Para os produtos de fermentação, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os AGCC, devido ao propionato apresentar diferença entre os tratamentos. Ocorreu diferença ($p < 0,05$) para o 4-Etilfenol, no qual o alimento teste apresentou maior quantidade deste composto. Em relação ao microbioma fecal, houve tendência ($p < 0,10$) para o filo Actinobacteriota, que foi maior no tratamento controle. Como conclusão, os dados do microbioma fecal, produtos de fermentação, CDA, aceitabilidade e parâmetros redox de gatos alimentados com DDGS, fornecem evidência de que essa fonte proteica e o nível de inclusão testado são adequados e podem ser seguramente incluídos até o nível de 15% em alimentos para gatos adultos saudáveis.

Palavras-chave: gatos; fenol; indol; microbioma; subproduto; etanol.

ABSTRACT

It was aimed to evaluate the inclusion of distillers dried grains with solubles (DDGS), with a 0 and 15% inclusion level, regarding the dry matter apparent digestibility, organic matter, crude protein, etheral extract, mineral matter, acceptability, fatty acid production of short (AGCC) and branched (AGCR) chains, urinary pH, phenol and indole production, fecal microbiome and redox parameters for domestic felines. The experiment was carried out at the Center for Studies in the Nutrition of Companion Animals of the Department of Zootechnics at UFLA, for a period of 2 months (January-February 2022). Sixteen mixed breed adult cats, male and female, weighing 4.16 ± 0.26 were used. The control food was offered to 8 animals while the test food was offered to the other 8 ones in a fully randomized design. The animals underwent a 20-day adaptation period, during which the acceptability test was performed. After this period, total collection of feces was carried out for 7 days for a digestibility analysis of dry matter (DM), organic matter (OM), mineral matter (MM) and etheral extract in acid hydrolysis (EEHA). The digestibility collection was used to achieve the equations proposed by Matterson et al., (1965) and calculate the ingredient digestibility coefficients. After this period, it began the collection of 3 days of feces for analysis of short-chain (SCFA), branched chain (AGCR) fatty acids, phenol, indole and fecal microbiome. At the end of the 60 days, blood was collected to evaluate enzymes related to oxidative status (catalase, glutathione, lipid peroxidation rate and superoxide dismutase). The variable of digestibility coefficients, acceptability and fermentation products were analyzed by the Shapiro Wilk Test and ANOVA, and the redox parameters were undergone to the T test, in an unpaired way, and those which did not have a normal distribution to the Mann-Whitney Test, considering probability of 5%. No significant differences ($p > 0.05$) were observed for the apparent digestibility coefficients (ADC) of DM, CP and EEHA, but there was a difference ($p < 0.05$) for the ADC of MM and MO. For the redox parameters, there was no significant difference for most of the evaluated enzymes, except for catalase, which showed a trend. For fermentation products, there was a significant difference ($p < 0.05$) for SCFA, because the propionate presents difference among treatments. There was a difference ($p < 0.05$) for 4-Ethylphenol, in which the test food had the highest amount of this compound. Regarding the fecal microbiome, there was a statistical trend ($p < 0.10$) for the Actinobacteriota phylum, which was greater in the control treatment. As the outcome of this study, data on the fecal microbiome, fermentation products, ADC, acceptability and redox parameters of cats fed with DDGS provide evidence that this protein source and the inclusion level tested are adequate and can be safely included up to the level of 15 % in food for healthy adult cats.

Keywords: cats; phenol; indole; microbiome; by-product; ethanol.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

O presente estudo teve por objetivo avaliar a inclusão do resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS) em alimento seco extrusado para gatos. Este ingrediente tem potencial uso na alimentação animal, visto que é um ingrediente com alto teor proteico e porção fibrosa interessante. O DDGS é obtido através da fermentação do milho para obtenção do etanol. Com este trabalho, foi possível avaliar a digestibilidade aparente dos nutrientes e do ingrediente, além de avaliar parâmetros de saúde intestinal em gatos. Esse foi o primeiro trabalho com dados para gatos, visto que na literatura só é encontrado trabalho com cães. Sendo assim, além de obter resultados positivos com a inclusão desse ingrediente, o mesmo pode levar a redução no uso de ingredientes de origem animal e pode ser um ingrediente com potencial uso em dietas veganas, com valores muito bons de digestibilidade aparente de proteína bruta. Além disso, devido a alta demanda por produção de alimento para animais, este subproduto tem potencial uso para dietas de cães e gatos, obtendo resultados positivos para saúde intestinal e tendência para redução de isobutirato que é um ácido graxo de cadeia ramificada (leva a odor indesejável das fezes), e houve diferença estatística para produção de ácidos graxos de cadeia curta (benéficos a saúde intestinal). Este trabalho tem como impacto principalmente meio ambiente, tecnologia e produção.

Social, technological, economic and cultural impacts

This current study had the objective to estimate the inclusion of distillers dried grains with solubles (DDGS) in extruded dried food for cats. This ingredient has potential use in animal feeding, since is a ingredient with high protein content and an interesting fiber portion. DDGS is obtained by corn fermentation for ethanol obtainment. With this study it was possible to measure the nutrients and the ingredient apparent digestibility, besides to evaluate the intestinal health parameter in cats. This was the first study with data to cats, since in the literature it's only found studies with dogs. As such, besides getting positive results with this ingredient inclusion, it can take a reduction in the use of animal origin ingredients and it can have potential use em vegan diets, with very good values of aparent digestibility of gross protein. Furthermore, because of the high demand for production of food to these animals this subproduct has potencial use in diets for dogs and cats, obtaining posite results for the intestinal healt and inclination to reduction of isobutyrate, which is a branched chain fatty acid (it takes to an undesirable smell in stool), and it had statistics difference to production of short chain fatty acids (benefical to the intestinal health). This study has impact in the environment, technology and production.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 PROTEÍNA E SUA FUNÇÃO NO ORGANISMO ANIMAL	12
2.2 FIBRA E SUA FUNÇÃO NO ORGANISMO ANIMAL.....	13
2.3 SAÚDE INTESTINAL DE CÃES E GATOS.....	14
2.3.1 16 RRNA.....	16
2.3.2 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC).....	18
2.3.3 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA RAMIFICADA (AGCR), FENOL E INDOL 20	
2.4 RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS).....	22
2.5 PARÂMETROS REDOX.....	25
REFERÊNCIAS	28
SEGUNDA PARTE - ARTIGO	37
AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) EM DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS.....	37
AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) EM DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
LOCAL DO EXPERIMENTO E INSTALAÇÕES.....	40
ANIMAIS, TRATAMENTO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
PROTOCOLO EXPERIMENTAL, COLETA DE AMOSTRA E ANÁLISES	41
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
ACEITABILIDADE, DIGESTIBILIDADE E PH URINÁRIO	45

ENZIMAS RELACIONADAS AO STATUS ANTIOXIDANTE	49
MICROBIOMA FECAL	50
PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO (AGCC, AGCR, FENOL, INDOL E AMÔNIO)54	
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	57

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade dos alimentos para animais de companhia estão é um tema cada vez mais frequente na mente dos proprietários, principalmente, devido a crescente “humanização” ou antropomorfismo desses animais por seus proprietários (CHEN et al., 2012). Nesse contexto, a utilização de ingredientes alternativos aos convencionais ou subprodutos torna-se viável e necessária para atender essa demanda, desde que se conheça as características nutritivas, tais como, composição química, digestibilidade dos nutrientes, fatores antinutricionais e toxidez (PACHECO, 2013).

De acordo com Silva et al. (2016), um subproduto que apresenta grande potencial para uso na alimentação animal, em virtude de sua composição nutricional e baixo custo, é o resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS), resultante da fermentação do milho para obtenção de etanol. Contudo, no Brasil ainda é pouco conhecido e utilizado para animais de companhia, sendo escassos trabalhos com cães e não foi encontrado literatura para gatos.

O DDGS apresenta composição nutricional relevante, devido à alta quantidade de proteína bruta. Fato que o torna interessante para os animais carnívoros domésticos. Principalmente, os gatos que são considerados animais carnívoros estritos e com alta exigência de proteínas. Além disso, o DDGS apresenta perfil de fibras insolúveis e solúveis atrativo, que podem melhorar a funcionalidade intestinal dos animais. Podendo apresentar efeito prebiótico, levando a diminuição na produção de compostos putrefativos.

Diante disso, estudos com DDGS são necessários para avaliar sua inclusão em dietas para animais, principalmente para gatos que possuem paladar mais exigente quando comparado a cães. Uma possível forma de testar a inclusão do DDGS na dieta de felinos é através da técnica de substituição, descrita por Matterson e colaboradores em 1995. Se trata de um método utilizado em estudos de nutrição animal para avaliar o valor energético de diferentes alimentos. Assim, ocorre a substituição de uma parte da dieta de referência por um alimento teste. A diferença na energia metabolizável entre a dieta de referência e a dieta teste é então atribuída ao alimento teste.

Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros de digestibilidade, aceitabilidade, AGCR, fenol, indol, amônia, AGCC, microbioma fecal e parâmetros redox em dieta para felinos domésticos contendo este subproduto.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Proteína e sua função no organismo animal

As proteínas são compostos orgânicos constituídos principalmente por nitrogênio, carbono, hidrogênio e oxigênio, mas também, pode conter outros átomos como, o fósforo, enxofre e ferro (NELSON; COX, 2014). São formadas por aminoácidos, os quais apresentam uma cadeia lateral no carbono alfa (NRC, 2006), que se liga a um grupo amina (NH₃), a um grupo carboxílico (COOH), a um hidrogênio e uma cadeia lateral, com exceção da prolina (MARZZOCO; TORRES, 2007). As várias cadeias laterais contribuem para a estrutura secundária e terciária da proteína.

A proteína dietética é necessária por dois motivos. Primeiro, porque fornece aminoácidos que cães e gatos não podem sintetizar (aminoácidos essenciais), mas são necessários para a síntese de muitas proteínas no corpo. Em segundo lugar, a proteína fornece aminoácidos disponíveis (aminoácidos que podem ser sintetizados) que os animais precisam para manutenção, crescimento, gestação e lactação. Elas apresentam diversas funções no organismo animal, como função estrutural (proteínas fibrosas), constituintes de enzimas, síntese de hormônios (NRC, 2006), constituintes de anticorpos apresentando importante função no sistema imunológico (NRC, 2006; NELSON; COX, 2014).

A digestão da proteína dietética pelos animais envolve a clivagem enzimática da proteína em aminoácidos e pequenos resíduos de peptídeos que são capazes de serem absorvidos pelas células do intestino delgado. A digestibilidade da proteína é geralmente definida como a porcentagem de proteína ingerida que não é excretada nas fezes, medida pela entrada e saída de nitrogênio. A primeira abordagem para determinar a biodisponibilidade é medir a "digestibilidade aparente" da proteína em uma dieta. Isso fornece uma avaliação geral do nitrogênio absorvido, mas não fornece uma medida da "qualidade" ou eficiência da utilização do nitrogênio ou dos aminoácidos essenciais individuais (NRC, 2006).

Os gatos domésticos são considerados animais carnívoros estritos ou hipercarnívoros, pertencentes à família *Felidae* (SATO, 2017). Carnívoros em geral,

incluindo gatos, têm digestibilidades aparentes mais baixas de proteínas mal digeríveis (KENDALL et al., 1982; AHLSTROM; SKREDE, 1998) e requisitos mais elevados para alguns aminoácidos, como arginina (ANDERSON et al., 1979; COSTELLO et al., 1980).

2.2 Fibra e sua função no organismo animal

A inclusão de fontes de fibras em formulações de alimentos para cães e gatos tem sido bastante utilizada pela indústria. Esta prática ocorre devido aos benefícios da ingestão deste nutriente, por auxiliar na manutenção da saúde do trato gastrointestinal (REINHART; SUNVOLD, 1996; SUNVOLD et al., 1995). A capacidade de manter a higidez do trato gastrointestinal está associada a diversas propriedades atribuídas às fibras, como função prebiótica (SWANSON et al., 2002; HESTA et al., 2003; BARRY et al., 2010), tempo de trânsito do alimento pelo trato gastrointestinal (FAHEY et al., 1990; CHANDLER et al., 1999; HILL et al., 2000), formação e consistência das fezes (BURKHALTER et al., 2001), entre outros.

Mesmo em gatos, considerados carnívoros estritos, são relatados efeitos importantes em resposta a suplementação dietética com fibras, destacando a importância fisiológica deste nutriente também para estes animais (LOUREIRO, 2012). As fibras, particularmente as solúveis, atuam como substrato para fermentação microbiana, produzindo ácidos graxos de cadeia curta que podem fornecer até 7% das necessidades energéticas em carnívoros (HERSCHEL et al., 1981; CHOUDHURY et al., 2018), além de fornecer energia para os colonócitos com a produção de butirato.

Fekete et al. (2004) realizaram um estudo com gatos adultos comparando a digestibilidade da polpa de beterraba (fonte de hemicelulose e pectina), alfafa (fonte de celulose) e casca de amendoim (fonte de lignina e celulose), através de inclusões em 10% na matéria seca. Os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo não foram prejudicados com a utilização da polpa de beterraba. Por outro lado, utilizando alfafa e casca de amendoim, foram observados decréscimos nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta, sendo os resultados da casca de amendoim os mais baixos.

As fibras se classificam quanto a sua solubilidade e fermentabilidade, sendo solúveis ou insolúveis, fermentáveis ou não. As fibras insolúveis, geralmente, são pouco fermentáveis, sendo eliminadas praticamente na sua forma intacta. Elas são compostas por polissacarídeos da parede celular (celulose e hemicelulose) e lignina.

Esse tipo de fibra tem sido utilizado para redução do valor energético da dieta (KAWAUCHI et al., 2011), controle de bolas de pelos em gatos (LOUREIRO et al., 2014), podendo prevenir e aliviar constipação.

Já as fibras solúveis, podem ser fermentadas pelos microrganismos presentes no cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta e lactato (NRC, 2006). Essas fibras correspondem aos polissacarídeos não celulósicos (beta glucano, pectinas, gomas e mucilagem) (PACHECO, 2020). Seus efeitos estão relacionados com redução dos níveis de colesterol, glicose e insulina no sangue (MÄLKKIA; VIRTANENB, 2001; WOOD, 2007), podem reduzir a digestibilidade principalmente de gordura e proteína (DIEZ et al., 1997; COLE et al., 1999; BURKHALTER et al., 2001). As frações insolúveis e solúveis podem ser encontradas em diferentes proporções nos ingredientes fibrosos (Pacheco, 2020). Desse modo, a inclusão deste tipo de ingrediente em alimentos para cães e gatos deve ser feita de acordo com o objetivo do alimento.

2.3 Saúde intestinal de cães e gatos

A mucosa intestinal de cães e gatos é estéril quando em condições fetais (SILVA, 2009; LISENKO, 2017), mas ao nascimento apresentam rápida colonização de diversos microrganismos. Esta colonização se dá principalmente pelo contato com ambiente, contato materno, idade, estado de saúde e dieta (FAHEY JUNIOR; BARRY; SWANSON, 2008), assim como ocorre em outros mamíferos. A microbiota intestinal exerce um papel importante tanto na saúde quanto na doença (SAAD, 2006), sendo que as alterações que ocorrem na microbiota podem ser positivas ou negativas para o animal.

O trato intestinal de mamíferos abriga uma comunidade microbiana complexa, sendo que a composição é determinante crítico da saúde do hospedeiro no contexto de metabolismo e inflamação. A morfologia da mucosa intestinal muda principalmente de acordo com a dieta, e essas mudanças podem modificar a fisiologia do intestino, influenciando a absorção intestinal e metabolização dos nutrientes (LISENKO, 2017).

Dos 52 filos bacterianos conhecidos atualmente, aproximadamente 5 a 7 são conhecidos por residirem no trato gastrointestinal de mamíferos (Shin et al., 2015), sendo os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* os predominantes em mamíferos (HANDL et al., 2011; SHIN et al., 2015). Uma microbiota intestinal desequilibrada, geralmente surge de um aumento do filo de *Proteobacteria*, e acredita-se que a prevalência deste

filo está relacionada a disbiose e risco de doenças (Shin et al., 2015). Esse filo é o mais instável entre os quatro principais (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*) (FAITH et al., 2013; Shin et al., 2015).

Handl et al., (2011), ao comparar microbiota intestinal de cães e gatos, observou que ambos possuem maior prevalência do filo *Firmicutes* (*Clostridium spp.* e *Lactobacillus spp.*, sendo 95,3% nos cães e 92,1% em gatos). Já o segundo filo mais predominante em cães, foi o *Bacteroidetes* (2,3%) e em gatos *Actinobacterias* (7,3%). Corroborando com esse estudo, Garcia-Mazcorro et al., (2011) relataram predominância de *Firmicutes*, seguido de *Actinobacteria*. Em um estudo com gatos, Ritchie et al., (2010) avaliaram o microbioma fecal de 15 animais e observaram que a predominância era de *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, respectivamente. Swanson e Deng (2015), relatam que os filios predominantes no intestino de cães e gatos são o *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria*.

O filo *Bacteroidetes* consiste principalmente em bactérias gram negativas (possuem parede celular menos espessa), além disso, possuem características fermentativas e que modulam o sistema imune intestinal benéficamente (FURUHASHI et al., 2007) e não necessitam de oxigênio para o crescimento, ou seja, são anaeróbios obrigatórios. Já o *Firmicutes*, possui parede celular e, portanto, são consideradas gram positivas. São representados principalmente por *Lactobacillus spp.* e *Clostridium spp.* Estes são gêneros que apresentam atividade imunomodulatória benéfica (FURUHASHI et al., 2007). Outro filo relatado em estudos anteriores como um dos predominantes, é o *Actinobacteria*, estes são bactérias gram positivas filamentosas, com alto teor de guanina e citosina em seus genomas (LECHEVALIER, 1965; ZIMMERMAN 1980). A maioria das bactérias deste filo são aeróbicas, capazes de utilizar várias fontes nutricionais, incluindo polissacarídeos complexos (Barka et al., 2015).

Nutrientes não digeridos vão para o intestino grosso e podem ser fermentados. Amido, PNAs, açúcares e oligossacarídeos fermentam no cólon proximal e proteína, enzimas endógenas e muco no cólon distal (DROCHNER; MEYER, 1991; CARCIOFI, 2017; MARSILIO et al., 2019). Carboidratos fermentáveis, por exemplo, levam a produção de AGCC e ácido lático.

A fermentação microbiana de aminoácidos não digeridos resulta na produção de diversos compostos de putrefação, como amônia, levando a uma desaminação de aminoácidos, fenóis, indóis (produtos de descarboxilação de aminas aromáticas), ácidos graxos de cadeia ramificada e várias aminas biogênicas, como putrecina,

cadaverina, histamina, entre outros (GOMES, 2013; LISENKO, 2017). Os catabólitos de origem proteica não só resultam em mau odor das fezes, como também podem ser tóxicos em altas concentrações (KUZMUK et al., 2005; YAMKA et al., 2006; Lisenko, 2017).

2.3.1 16 rRNA

Através do tópico anterior percebe-se que a saúde intestinal de gatos está intimamente relacionada as bactérias presentes no intestino desses animais. Contudo, no ambiente intestinal existe uma variedade de organismos, não se limitando apenas às bactérias. Sendo assim, sabe-se que o intestino abriga uma diversidade de entidades biológicas, incluindo vírus, fungos e outros procariontes (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019). No entanto, os trabalhos que tratam de populações de microrganismos intestinais presentes em gatos enfocam apenas nas populações bacterianas. Assim, neste trabalho, o termo “microbiota intestinal” será usado para se referir exclusivamente às bactérias que habitam o intestino.

Com base nessa definição, existem diversos métodos desenvolvidos para estudar a diversidade microbiana no trato gastrointestinal (TGI), alguns dos quais serão ilustrados na tabela subsequente.

Quadro 1 - Técnicas usadas para estudo da microbiota no intestino;

A	Métodos baseados na cultura
B	Métodos baseados em moléculas (baseados em ácidos nucleicos)
1	Métodos sem sequenciamento <ol style="list-style-type: none"> 1. Citometria de fluxo de hibridização in situ fluorescente; 2. Eletroforese em gel de campo pulsado; 3. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante; 4. Eletroforese em gel com gradiente de temperatura; 5. Polimorfismo de conformação de fita simples;
2	Métodos baseados em sequência <ol style="list-style-type: none"> 1. Sequenciamento de genes 16S rRNA ou suas regiões hipervariáveis (sequenciamento de genes alvo); 2. Sequenciamento de DNA do genoma bacteriano completo (metagenoma); 3. Sequenciamento de mRNA bacteriano completo (meta-transcriptoma);
3	Métodos baseados na detecção e quantificação de pequenos metabólitos

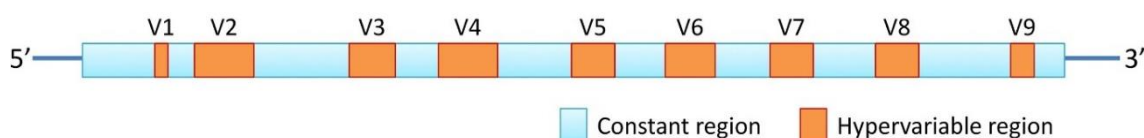
1. Espectrometria de massa por cromatografia gasosa;
2. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa;
3. Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier;
4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear e de prótons;

Fonte: Modificado de SARANGI; GOEL; AGGARWAL (2019)

A microbiota intestinal é composta por uma ampla gama de organismos, cada um com seu próprio nível de adaptabilidade ao crescimento em ambientes de cultura. Assim, as técnicas de cultura tendem a favorecer a proliferação de organismos aeróbios que se adaptam bem ao crescimento *in vitro*. Isso leva a uma representação insuficiente das bactérias anaeróbias existentes. Além disso, esses métodos geralmente subestimam a diversidade bacteriana no lúmen intestinal. Portanto, seu uso para investigar alterações na composição da microbiota intestinal é limitado (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019).

Desta forma, novas técnicas foram necessárias para representar melhor a composição da microbiota intestinal. O avanço tecnológico dos últimos anos, permitiu que as espécies bacterianas fossem identificadas através das sequências do RNA ribossômico 16S (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019). Esta técnica então foi denominada 16S rRNA, e está embasada no fato que este gene, 16S, apresentam regiões altamente conservadas para a criação de primers e regiões hipervariáveis para a identificação de características filogenéticas de microrganismos. As sequências completas do gene 16S rRNA incluem nove regiões hipervariáveis (V1 a V9) (Figura 2), alternando com nove regiões altamente conservadas (BAKER; SMITH; COWAN, 2003; TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; WANG; QIAN, 2009; YANG; WANG; QIAN, 2016).

Figura 1 - Uma representação do gene 16S do RNA ribossômico mostrando as nove regiões hipervariáveis (em marrom) e regiões constantes (em azul).



Fonte: SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019

Para o sequenciamento do gene 16S utiliza-se a técnica de PCR, no qual ocorre a amplificação dos genes através da utilização de primers voltados para uma ou mais

regiões do 16S rRNA. Para o reconhecimento taxinômico das espécies bacterianas as sequências obtidas do gene 16S são organizadas em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Para ser classificado como parte de uma OTU, um gene deve ter pelo menos 97% de identidade no alinhamento do gene (ELLEGAARD; ENGEL, 2016).

A diversidade microbiana, expressa em OTUs, pode ser descrita como diversidade alfa e beta. A β -diversidade demonstra o quão similares ou disparem estão a população de bactérias em relação a diferentes amostras. Há vários índices frequentemente utilizados para calcular a diversidade beta, tais como o índice de Bray-Curtis, o índice Unifrac, o índice de Jaccard e a distância de Aitchison. Cada um desses índices destaca diferentes características da diversidade. Por exemplo, o índice Unifrac considera informações filogenéticas (SU, 2023).

Em contrapartida, a α -diversidade, que inclui a riqueza da comunidade e a diversidade da comunidade, é usada para estimar o número total de espécies em um ambiente específico e a uniformidade relativa das espécies em uma amostra, respectivamente (WILLIS, 2019). Métricas como o índice Chao1, o estimador de cobertura baseado em abundância (ACE) e o número de espécies observadas (ou seja, o número de diferentes OTUs por amostra) são amplamente utilizadas para estimar a alfa diversidade, fornecendo uma estimativa do número total de espécies em uma comunidade (FINOTELLO et al., 2018; HAGERTY et al., 2020; QIAN et al., 2020, LI et al., 2022).

Diferentemente das métricas descritas acima, existe outra forma de avaliar a α -diversidade através da avaliação a uniformidade relativa das espécies presentes em uma amostra, chamada de “diversidade da comunidade”. Assim, considera-se a tanto a riqueza e a distribuição de espécies naquele meio. Os índices de Simpson e Shannon geralmente são ótimos indicadores da diversidade da comunidade (FINOTELLO et al. 2018; HAGERTY et al., 2020; QIAN et al., 2020, LI et al., 2022).

2.3.2 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC são substâncias produzidas a partir da ação de bactérias do cólon num processo de fermentação anaeróbia de fibras ingeridas na dieta (GRECA, 2000), como também amido resistente, PNAs e açúcares não absorvidos (LISENKO, 2017). Esses nutrientes alcançam o cólon e tornam-se disponíveis para fermentação bacteriana, fornecendo matéria orgânica adequada para o intestino grosso (DROCHNER; MEYER, 1991). Na literatura encontra-se diversos benefícios dos

AGCC para saúde intestinal, como por exemplo a proliferação de bactérias eubióticas (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) com redução de bactérias de potencial patogênico (*Clostridium perfringens* e *Escheria coli*) (MYINT et al, 2017; SUCHODOLSK et al, 2012; ALSHAWAQFEH et al., 2017).

Os principais AGCC produzidos pela microbiota são o ácido acético, propiônico e butírico. Estes, principalmente o butirato, são fontes de energia para os colonócitos (NRC, 2006), cerca de 4,5 vezes mais que glicose (CARCIOFI, 2017). O ácido acético e propiônico são prontamente absorvidos e entram na corrente sanguínea, sendo fonte de energia extra para o hospedeiro (NRC, 2006).

Com a produção dos AGCC e ácido láctico, ocorre redução do pH, o que pode apresentar efeito prebiótico no intestino (SILVA, 2015), e de maneira geral, estes têm atividade antibacteriana. Um estudo realizado por Sket et al., (2017), verificou-se o rastreamento metagenômico em cães e gatos e observou-se que esses animais possuem rota metabólica diferente associada à produção de butirato. Este tem sido apontado como responsável pela capacidade de reverter alterações neoplásicas, efeitos nutritivos sobre o epitélio do cólon e indução a apoptose em células danificadas (MENTSCHEL; CLAUS, 2003).

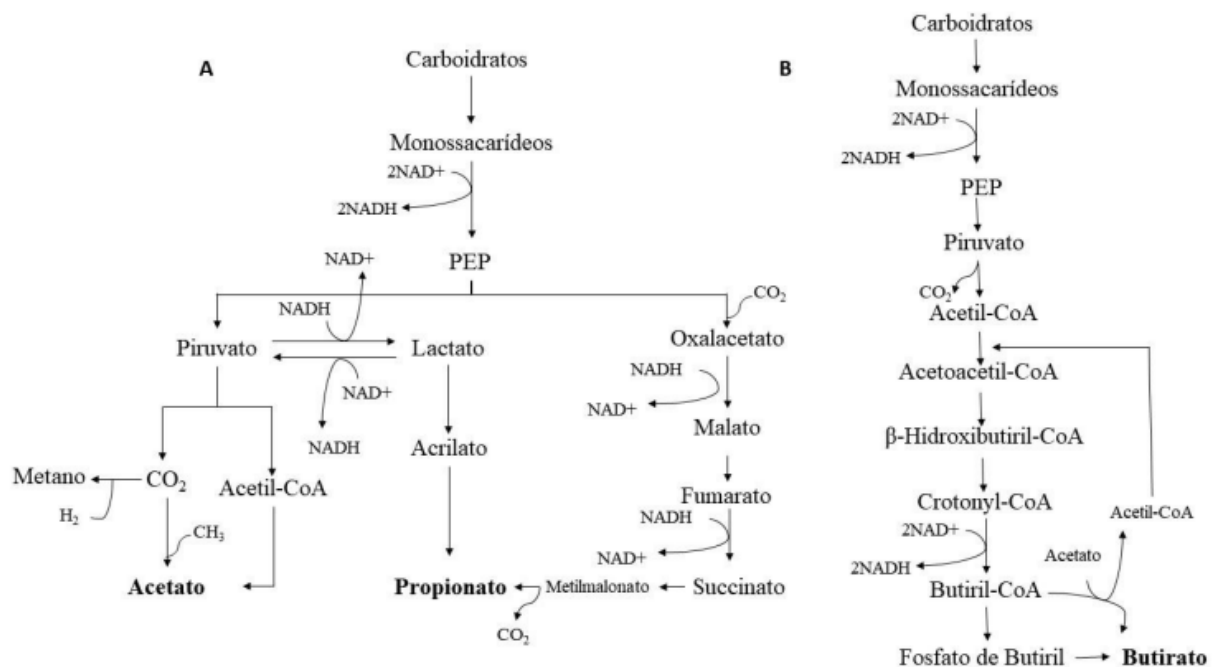
Alguns microrganismos são responsáveis pela produção dos AGCC, como por exemplo *Prevotella spp.*, *Faecalibacterium spp.*, *Blautia*, *Bifidobacterium spp.* A produção desses metabólitos por microrganismos é um processo complexo, em que uma bactéria pode fornecer substratos para outros gêneros, o chamado metabolismo cruzado (GOMES, 2013). Como exemplo disto, Belenguer et al. (2006) demonstraram que em culturas de *Bifidobacterium adolescentis* houve produção de butirato pelo metabolismo cruzado com cepas de *Eubacterium hallii*, em seres humanos. Corroborando com as informações anteriores, den Besten et al. (2013), relatam que o filo *Bacteroidetes* são os maiores produtores de acetato e propionato e o filo *Firmicutes* tem o butirato como principal composto produzido.

Um destaque para o filo *Firmicutes* é a presença de *Faecalibacterium prausnitzii*, única espécie conhecida do gênero *Faecalibacterium*, a qual demonstra atividade anti-inflamatória devido à produção de butirato (Sokol et al., 2008), e é reconhecida como a espécie produtora de butirato mais importante no intestino (XU et al., 2021). O butirato tem ação anti-inflamatória devido interação com receptores transmembrana específicos que regulam a inflamação através da ativação do fator nuclear NF- κ B. Isso reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias (CHEN; VITETTA, 2018), e o propionato inativa uma das proteínas acessórias que

potencializam o efeito de lipopolissacarídeos de membrana sobre o receptor TLR4 (HOYLES et al., 2018), reduzindo assim a inflamação excessiva no intestino.

A fermentação para produção de ácido butírico pode ser realizada por três vias metabólicas, sendo elas: a sequência de reação de beta-oxidação reversa e duas vias alternativas a partir do butiril CoA (LOUIS et al., 2007). Já o ácido acético é co-substrato para esta reação e tem sido relatado que altas concentrações de acetato estimulam a síntese de CoA-transferase em bactérias butíricas, o que poderia levar a aumento na síntese de ácido butírico (Gomes, 2013). Contribuindo com os autores anteriores, Miller e Wolin (1979), relatam que a carboxilação do piruvato a fosfoenolpiruvato gera o oxalacetato que pode ser reduzido a succinato, que por sua vez é agente formador do do propionato. O piruvato também pode originar a Acetil Coenzima A que pode ser convertida a acetato e propionato (DEN BESTEN et al., 2013), conforme ilustrado na figura 1.

Figura 2 - Esquema de mecanismos para produção de AGCC pelas bactérias. A: acetato e propionato; B: butirato.



Fonte: adaptado de DEN BESTEN et al., 2013.

2.3.3 Ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), fenol e indol

Os aminoácidos não digeridos resultam na produção de diversos compostos de putrefação por microrganismos proteolíticos no cólon (SOUZA et al., 2017; MARSÍLIO et al., 2019). Esses microrganismos estão presentes em maior concentração no cólon distal (MARSÍLIO et al., 2019), e são responsáveis pela fermentação de compostos

proteolíticos, gerando catabólicos como fenóis, indóis, amônia, aminas biogênicas e ácidos graxos de cadeia ramificada (SWANSON et al., 2002; KUZMUK et al., 2005; MIDDELBOSS et al., 2007; SOUZA et al., 2017). Além de causar mau odor das fezes, alguns desses compostos são tóxicos às células da mucosa intestinal, podendo gerar colite e carcinogênese do cólon (SWANSON et al., 2002; MIDDELBOSS et al., 2007).

Os AGCR são formados a partir da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada, como valina, leucina e isoleucina (HANG et al., 2013; TJELLSTROM et al., 2005) e os produtos da fermentação desses aminoácidos são respectivamente isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato (MACFARLANE et al., 1992). Alguns dos microrganismos responsáveis por gerar a produção dos catabólicos proteicos pela fermentação são *Clostridium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Desulfovibrio spp.* O pH intestinal aumenta com adição de proteínas na dieta (EPHRAM et al, 2020), e esse aumento contribui para proliferação de microrganismos com potencial patogênico. Hang et al. (2013), avaliaram três dietas para cães, alto teor de carboidratos (HCS), alto teor proteico – farinha de torresmo (HPGM) e alimento comercial seco (DC), e perceberam aumento na produção de AGCR, pH fecal e redução de ácido acético e propiônico. Além disso, nesse estudo eles utilizaram um biomarcador relacionado com inflamação intestinal (calprotectina), e verificaram que os cães alimentados com alta proteína tiveram concentração muito alta desse marcador. Isso mostra que o excesso de proteína pode ser tóxico para a mucosa intestinal.

Andreesen, Bahl e Gottschalk (1989) relatam que algumas espécies de bactérias do gênero *Clostridium spp.* são responsáveis pela formação de fenóis e indóis. Um exemplo é a espécie *C. tetan* que produz estes compostos a partir da fermentação da fenilalanina e triptofano, respectivamente. *C. diffici* possui como produto da fermentação da tirosina o 4-metilfenol (p-cresol), e *C. tetanomorphum* produz fenol a partir da fermentação da tirosina. A fermentação proteolítica pode levar ao aumento da produção desses metabólitos que são potencialmente tóxicos (YOKOYAMA et al., 1982; MACFARLANE et al., 1992). De fato, a desaminação de aminoácidos de proteínas dietéticas é a principal fonte de amônia, fenóis e indóis no colón e esses produtos passam facilmente pela parede intestinal, obtendo acesso a outros tecidos do corpo (ROLAND et al., 1995). Esses produtos podem prejudicar o desenvolvimento da mucosa intestinal.

Ephraim et al. (2020) estudaram o efeito de dietas com diferentes níveis de proteína (baixa 18,99%; média 25,35% e alta 45,77%) em cães por 90 dias. Constatou-se aumento na proporção de sulfato de 4-metoxifenol, sulfato de 4-

vinilfenol, 2-(4-hidroxifenil) propionato e sulfato de p-cresol na urina de cães, e o autor relata que esses compostos estão ligados a doenças e inflamações nos rins. O autor relata ainda altos níveis de indóis tóxicos (sulfato de 5-hidroxiindol e sulfato de 7-hidroxiindol) na urina quando os cães foram alimentados com a dieta de alto nível proteico. Além disso, no intestino os níveis de indol e indolin-2-one aumentaram, enquanto o nível de indóis benéficos ao organismo (índole-3-lactato, indol-3-acetato, indol-3-propionato e 2-oxindol-3-acetato), diminuíram significativamente.

Lisenko (2017) ao avaliar a inclusão de farinha de insetos em dieta para gatos, verificou que não houve diferença significativa para produção de fenol e indol. Segundo a autora, isso é desejável, pois fenóis e indóis possuem potencial para interagir com outros compostos putrefativos no intestino, potencializando suas ações carcinogênicas por atuarem como cocarcinógenos (Cummings e Macfarlane, 1991).

2.4 Resíduo Seco da Destilaria com Solúveis (DDGS)

A demanda por combustível limpo (etanol, diesel e gás), conhecido como biocombustíveis, tem impulsionado os países a desenvolverem suas próprias tecnologias. A produção de etanol a partir do milho tem sido destaque nesse contexto, visto que o aquecimento global induz para o uso de energia limpa. Fatores como fomentar fontes de energia de menor impacto ambiental (capazes de reduzir emissões de gases do efeito estufa) e reduzir a dependência de importações de petróleo (LEITE; CORTEZ, 2008; GURGEL, 2011), contribuem para que ocorra intensificação na produção de etanol.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e ocupa segundo lugar na geração global de etanol, aproximadamente 35,58 bilhões de litros. Desse montante, 1,6 bilhão é produzido a partir do milho (UDOP, 2020). A produção se concentra tendo a cana-de-açúcar como base, contudo ela não pode ser estocada (MILANEZ et al., 2014). Isso impacta a produção de etanol nos períodos de entressafra, e nesse cenário, o milho surge como alternativa para produção de etanol (MARTINS, 2018).

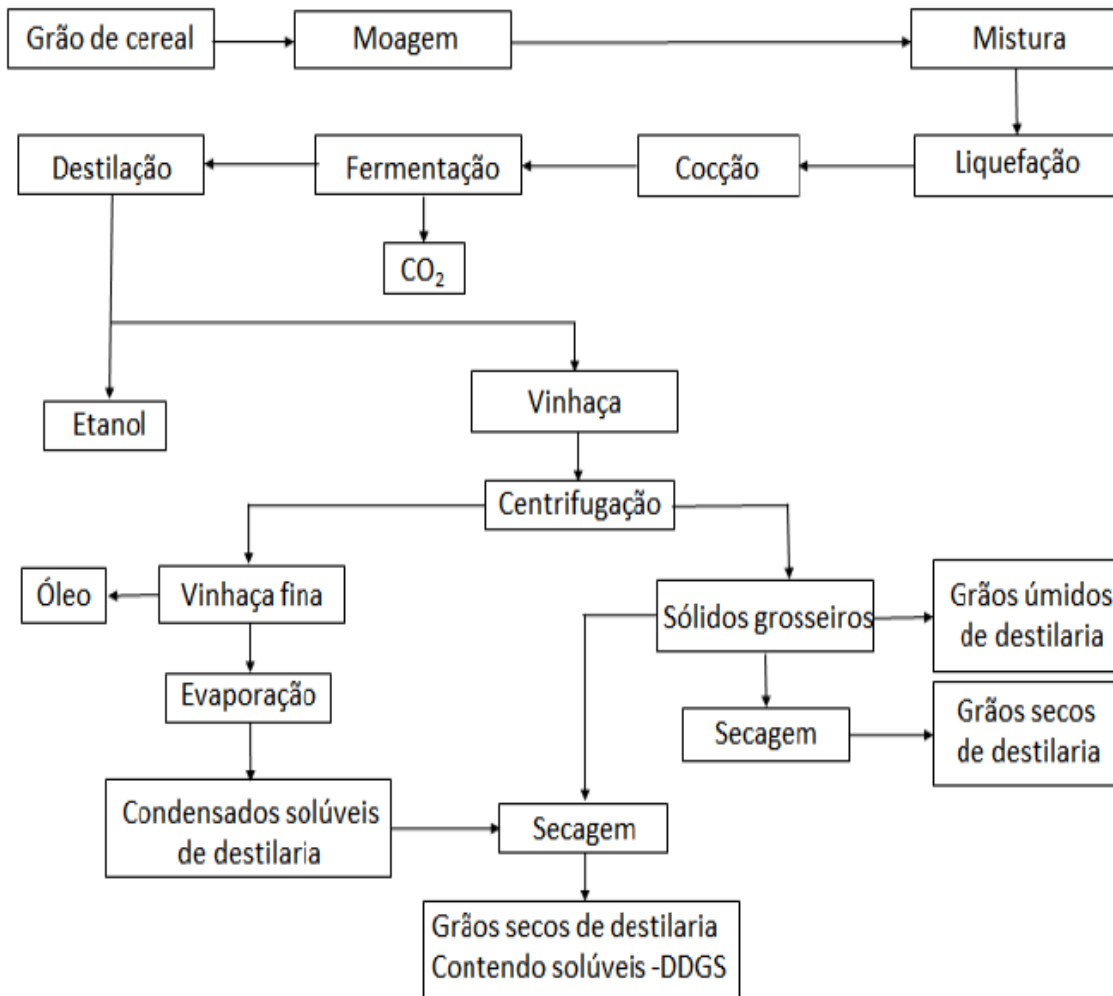
A utilização do milho, dá origem ao etanol, óleo, proteínas para ração animal (DDGS) (MILANEZ et. al., 2014), vinhaça, entre outros. O grão de milho é convertido em etanol, basicamente, por dois processos: moagem úmida ou moagem seca. Na moagem úmida, a semente de milho é fracionada em componentes primários (amido, gérmen e fibra), e na moagem seca existem seis etapas majoritárias (ALVES et al., 2012). Na produção por moagem a seco, o processo que origina os diferentes tipos

de grãos de milho de destilaria, geralmente possui as seguintes etapas: moagem, cozimento, liquefação, fermentação, destilação e separação.

Neste tipo de produção, a primeira etapa consiste na moagem do milho, seguido pelo cozimento onde receberá água, para iniciar a hidrólise do amido. Em seguida, a mistura vai para o tanque de liquefação, onde geralmente ocorre a sacarificação (adição de enzimas para que ocorra a hidrólise do amido em açúcares menores [glicose]). A quarta etapa consiste na fermentação, no qual a glicose é transformada em etanol pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ALVES et al., 2012). Pode ocorrer produção de outros subprodutos que seguem por rotas alternativas. Posterior a fermentação, ocorre a destilação, onde gera etanol e vinhaça bruta.

A vinhaça bruta segue para centrifugação, gerando resíduo sólido e líquido. A parte líquida (vinhaça fina) passa por uma etapa de evaporação, em que se gera o óleo, que passa por decantadora, e o xarope (condensados solúveis). Este último pode ser adicionado a parte sólida, o DDG, e passar pela secagem, gerando o DDGS (*dried distillers grains with solubles*). O esquema de produção está representado na figura 3.

Figura 3 – Processamento do etanol de milho e seus subprodutos na moagem seca.



Fonte: Adaptado de Pedersen et al. (2014).

O DDGS é um subproduto que apresenta alta concentração de proteína bruta (30,9%) e fibra bruta (7,2%) (SPIEHS et al., 2002), sendo a maior parte insolúvel (PEDERSEN et al., 2014). O grande problema para utilização do DDGS na alimentação animal é devido à grande variabilidade na composição nutricional (Tabela 1). Fatores como qualidade do milho, processamento, variação no conteúdo nutricional do milho, diferenças na temperatura e tempo de secagem (Brito, 2008), influem diretamente nessa variabilidade.

Este ingrediente apresenta alto teor de fibra em detergente neutro (FDN) em relação à fibra em detergente ácido (FDA) (SILVA et al., 2016), portanto caracteriza-se como subproduto de alta concentração de hemicelulose (SPIEHS et al., 2002). Devido a maior parte da fibra ser insolúvel, são caracterizadas por serem indigestíveis, de pouca fermentação, excretadas intactas e com redução na absorção de nutrientes.

Essas fibras estimulam o peristaltismo através da ação na musculatura da parede intestinal (NRC, 2006).

Tabela 1. Média, coeficiente de variação e variação dos nutrientes no DDGS

Nutrientes	Média (CV)	Varição
Proteína Bruta (%)	30,9 (4,7)	28,7 – 32,9
Extrato Etéreo (%)	10,7 (16,4)	8,8 – 12,4
Fibra Bruta (%)	7,2 (18,0)	5,4 – 10,4
Matéria Mineral (%)	6,0 (26,6)	3,0 – 9,8
Lisina (%)	0,90 (11,4)	0,61 – 1,06
Arginina (%)	1,31 (7,4)	1,01 – 1,48
Triptofano (%)	0,24 (13,7)	0,18 – 0,28
Metionina (%)	0,65 (8,4)	0,54 – 0,76
Fósforo (%)	0,75 (19,4)	0,42 – 0,99

Fonte: Spiehs et al. (2002)

Além disso, o DDGS apresenta de 25-30% de polissacarídeos não amiláceos (PNAs), sendo os dois principais componentes arabinoxilano e celulose (PEDERSEN et al., 2014; JAWORSKI et al., 2015). Os maiores efeitos de PNAs são associados com a viscosidade e sua interação com a microbiota intestinal (CHOCT, 1997), e tal fato pode ser interessante, pois a ação de microrganismos que produzem enzimas para degradar os PNAs em monossacarídeos, podem fermentar (CARCIOFI, 2017) e são transformados em AGCC, que são absorvidos no ceco (TAVERNARI et al., 2008).

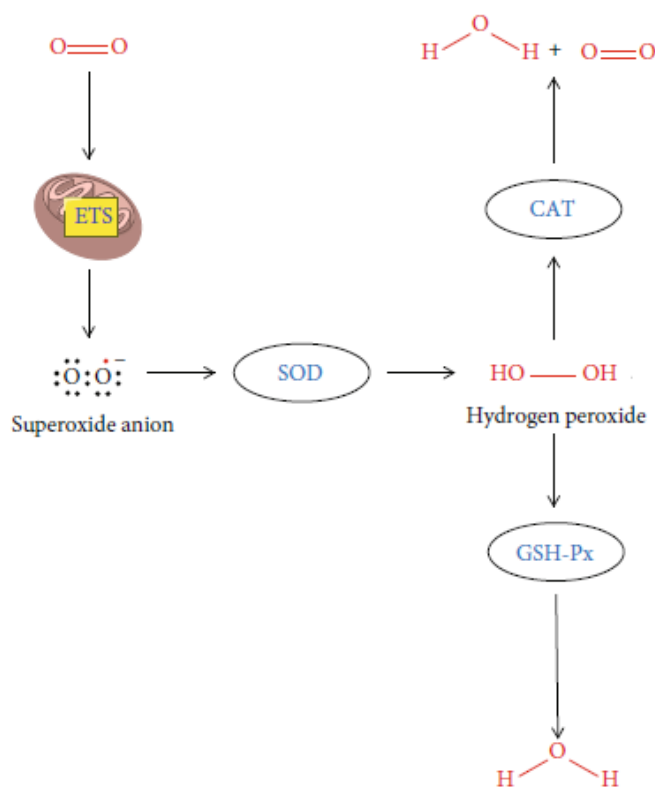
Recentes estudos com a utilização de proteínas hidrolisadas de milho ou peptídeos apresentam características antioxidantes. Em um estudo realizado por Hu et al., (2020), eles avaliaram a concentração plasmática de antioxidantes em frangos de corte alimentados com DDGS e DDGS hidrolisado com enzima. Em comparação ao grupo controle, frangos alimentados sem DDGS (com ou sem enzima), houve diferença significativa na atividade antioxidante no plasma sanguíneo.

2.5 Parâmetros redox

O oxigênio é um elemento essencial para os organismos aeróbios, sendo o receptor terminal dos elétrons durante a respiração, que é a principal fonte de energia nesses organismos. No entanto, o oxigênio é tóxico quando fornecido em

concentrações maiores que as do ar (GAO et al., 1998). Gershman et al., (1954) propuseram que os efeitos nocivos do oxigênio eram devido a formação de radicais livres derivados dele mesmo. Isso não foi confirmado até que uma enzima, a superóxido dismutase (SOD), fosse descoberta em 1968. Essa enzima catalisa a dismutação do superóxido de hidrogênio em peróxido de hidrogênio (MCCORD et al., 1968; NANDI et al., 2019), sendo que estes são degradados pela catalase ou glutathiona peroxidase (Figura 3). Devido a este motivo, ela é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio.

Figura 4 - Relação entre diferentes enzimas antioxidantes.



Fonte: Adaptado de Nandi et al., 2019

Uma outra enzima relacionada com ação antioxidante é a glutathiona, que é um tripeptídeo solúvel em água e de baixo peso molecular (WU et al., 2004). A sua principal função está relacionada com ação antioxidante (SIES, 1999; PASTORE et al., 2003). A glutathiona (GSH) é composta por um tiol, que é um agente redutor (PASTORE et al., 2003; TOWNSEND et al., 2003). Existem as formas reduzida e oxidada nas células, além da glutathiona peroxidase (GPx) e redutase (Huber et al., 2008). A glutathiona reduzida reage com o radical livre e forma a glutathiona oxidada. O

mecanismo de ação desta enzima está envolvido em 2 reações, reagindo primeiramente de forma não enzimática e posteriormente de forma enzimática.

O corpo tem um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo no qual moléculas enzimáticas e não enzimáticas, são os dois componentes principais. Este sistema de defesa antioxidante consiste em algumas enzimas, como é o caso da catalase. Essa enzima está relacionada com estresse oxidativo, e é uma das enzimas antioxidantes mais importantes, estando presente em quase todos organismos aeróbicos (NANDI et al., 2019). Em humanos, ela tem sido relacionada com várias doenças relacionadas à idade, como por exemplo a Doença de Alzheimer, Parkinson, diabetes, entre outras. Porém, mais estudos são necessários para confirmar se a catalase pode ser usada como medicamento para estes transtornos.

Os radicais livres são espécies independentes que consistem em um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais atômicos. São geralmente instáveis, de curta duração, mas quimicamente reativos (NANDI et al., 2019). Eles podem oxidar todas as biomoléculas celulares, como os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Por exemplo, a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados leva à produção de 4-hidroxinonal, que é um dos principais aldeídos reativos produzidos pelo estresse oxidativo (UCHIDA et al., 2003; Nandi et al., 2019). Os radicais livres são produzidos nas células durante o metabolismo celular, e há uma hipótese de que o estresse oxidativo é uma das principais causas para o envelhecimento.

A peroxidação lipídica vem oferecendo contribuição para várias células fisiopatológicas e anormalidades teciduais (JIANG et al., 1991). A avaliação do dano oxidativo em tecidos expostos ao estresse oxidativo tem sido difícil de ser obtida pela medição direta de alterações oxidativas, tais como danos por radicais hidroxila ou acúmulo de produtos da peroxidação lipídica (HALLIWELL et al., 1987; Wolff et al., 1986; Jiang et al., 1991). Ao estudar os parâmetros redox, como a atividade das enzimas supracitadas (SOD, CAT e GPx), além dos níveis de GSH e a taxa de peroxidação lipídica (LPO) é possível analisar o funcionamento do sistema antioxidante. A LPO ocorre como consequência do estresse oxidativo, processo que se dá quando as espécies reativas de oxigênio sobrecarregam o sistema de defesa (NOGUEIRA et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- AHLSTROM, O.; SKREDE, A. Comparative nutrient digestibility in dog, blue fox, mink and rat. **Journal of Nutrition.**, v.128, p.2676-2677, 1998.
- ALSHAWAQFEH, M. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 11, p. 136, 2017.
- ALVES, J. O. et al. Síntese de nano materiais de carbono a partir do resíduo de milho (DDGS). **Química Nova**, v.35, p. 1534-1537, 2012.
- ANDREESEN, J. R., BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus Clostridium in Clostridia. *Biotechnology Handbooks 3*. Edited by N. P. Minton & D. L. Clarke. New York: Plenum. p. 27 – 62. 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. (ABINPET). **Mercado pet Brasil. 2022**. Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em: 30 nov. 2021.
- BAKER, G. C., SMITH, J. J., COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BARRY, K. A. et al. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 9, p. 2978-2987, 2010.
- BELENGUER, A. et al. Two routes of metabolic cross-feeding between Bifidobacterium adolescentis and butyrate-producing anaerobes from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 5, p. 3593-3599, 2006.
- BRITO, C. Uso do DDGS, um subproduto na produção do etanol, na alimentação de monogástricos. **Artigo técnico Poli-Nutri alimentos**. 2008.
- BURKHALTER T.M. et al. The ratio of insoluble to soluble fiber components in soybean hulls affects ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1978–1985, 2001.
- CARCIOFI, A. **Fisiologia digestiva de cães e gatos – Introdução**. Figura 5 - Dimensão do tamanho intestinal de cães e gatos. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/clinicacv/AULUSCAVALIERICARCIOFI/fisiologia-digestiva-caes-e-gatos-2017-resumido.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2022.
- CHANDLER, M. L. et al. Gastric emptying and intestinal transit times of radiopaque markers in cats fed a high-fiber diet with and without low-dose intravenous diazepam. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 40, n. 1, p. 3-8, 1999.

CHEN, A.; HUNG, K.; PENG, N. A cluster analysis examination of pet owners' consumption values and behavior—segmenting owners strategically. **Journal of Targeting, Measurement and Analysis for Marketing**, v. 20, p. 117-132, 2012.

CHEN, J.; VITETTA, L. Inflammation-modulating effect of butyrate in the prevention of colon cancer by dietary fiber. **Clinical colorectal cancer**, v. 17, n. 3, p. e541-e544, 2018.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. **Feed milling international**, v. 191, n. 1, p. 13-26, 1997.

COLE, J. T. et al. Soybean hulls as a dietary fiber source for dogs. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 4, p. 917-924, 1999.

CUESTA, C. M. et al. TLR4 deficiency affects the microbiome and reduces intestinal dysfunctions and inflammation in chronic alcohol-fed mice. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12830, 2021.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. 1991.

DEB-CHOUDHURY, S. et al. The effects of a wool hydrolysate on short-chain fatty acid production and fecal microbial composition in the domestic cat (*Felis catus*). **Food & function**, v. 9, n. 8, p. 4107-4121, 2018.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.

DENG, P.; SWANSON, K. S. Companion Animals Symposium: Future aspects and perceptions of companion animal nutrition and sustainability. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 3, p. 823-834, 2015.

DIEZ, M. et al. Dietary fibre in dogs diet: comparisons between cellulose, pectin, guar gum, and between two incorporation rates of guar gum. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 78, n. 1-5, p. 220-229, 1997.

DROCHNER, W.; MEYER, H. Digestion of organic matter in the large intestine of ruminants, horses, pigs and dogs. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition Germany**, v. 65, p. 18-40, 1991.

ELLEGAARD, Kirsten M.; ENGEL, Philipp. Beyond 16S rRNA community profiling: intra-species diversity in the gut microbiota. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1475, 2016.

EPHRAIM, E.; COCHRANE, C.-Y.; JEWELL, D. E. Varying protein levels influence metabolomics and the gut microbiome in healthy adult dogs. **Toxins**, v. 12, n. 8, p. 517, 2020.

FAHEY JR, G. C.; BARRY, K. A.; SWANSON, K. S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 425-445, 2008.

FAHEY, G. C. Jr. et al. Dietary fiber for dogs: I. Effects of graded levels of dietary beet pulp on nutrient intake, digestibility, metabolizable energy and digesta mean retention time. **Journal of Animal Science**, v.68, p. 4221-4228, 1990.

FAITH, J. J. et al. The long-term stability of the human gut microbiota. **Science**, v. 341, n. 6141, p. 1237439, 2013.

FEDIAF. 2020. European Pet Food Industry Federation.

FEKETE, S. G. et al. Effect of different fibre types on the digestibility of nutrients in cats. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 88, n. 3-4, p. 138-142, 2004.

FINOTELLO, F; TRAJANOSKI, Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1031-1040, 2018.

FURUHASHI, M.; TUNCMAN, G.; GORGUN, C. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. **Massachusetts: Nature International Journal of Science**. v. 486, n. 21, p: 959–965, jun. 2007.

GAO, Ruomei et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.

GERSCHMAN, R. et al. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, n. 3097, p. 623-626, 1954.

Gomes, M. O. S. **Microbiota fecal, produtos de fermentação, aspectos histológicos da mucosa gastrintestinal e imunidade de cães beagle de diferentes grupos etários**. 2013. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária – Clínica Médica). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal – SP.

GURGEL, A. C. Impactos da Política Americana de Estímulo aos Biocombustíveis sobre a Produção Agropecuária eo Uso da Terra. In: **Anais do XXXVII Encontro Nacional de Economia [Proceedings of the 37th Brazilian Economics Meeting]**. ANPEC-Associação Nacional dos Centros de PÃ3s-Graduação em Economia [Brazilian Association of Graduate Programs in Economics], 2011.

HAGERTY, S. L. et al. An empirically derived method for measuring human gut microbiome alpha diversity: Demonstrated utility in predicting health-related outcomes among a human clinical sample. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0229204, 2020.

HALLIWELL, Barry; GROOTVELD, Martin. The measurement of free radical reactions in humans: some thoughts for future experimentation. **FEBS letters**, v. 213, n. 1, p. 9-14, 1987.

HANDL, S. et al. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 2, p. 301-310, 2011.

- HANG, I. et al. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2013.
- HE, C.; SHAN, Y.; SONG, W. Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. **Nutrition Research**, v. 35, n. 5, p. 361-367, 2015.
- HERSCHEL, D. A. et al. Absorption of volatile fatty acid, Na, and H₂O by the colon of the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 7, p. 1118-1124, 1981.
- Hesta, M. et al. Dietary supplementation of coated butyrate in healthy dogs: effect on apparent digestibility, faecal flora and faecal volatile fatty acids. **Veterinarni Medicina**. v.53, n. 3, p.147,2008
- HESTA, M. et al. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. **British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 6, p. 1007-1014, 2003.
- HILL R. C. et al. The effect of texturized vegetable protein from soy on nutrient digestibility compared to beef in cannulated dogs. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2162–2171, 2000.
- HOYLES, Lesley et al. Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. **Microbiome**, v. 6, p. 1-13, 2018.
- HU, R. et al. Antioxidant performances of corn gluten meal and DDGS protein hydrolysates in food, pet food, and feed systems. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100030, 2020.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.
- KAWAUCHI, I. M. et al. Digestibility and metabolizable energy of maize gluten feed for dogs as measured by two different techniques. **Animal feed science and technology**, v. 169, n. 1-2, p. 96-103, 2011.
- KENDALL, P. T.; BLAZA, S. E.; HOLME, D. W. Assessment of endogenous nitrogen output in adult dogs of contrasting size using a protein-free diet. **The Journal of Nutrition**, v. 112, n. 7, p. 1281-1286, 1982.
- KENDALL, P. T.; HOLME, D. W. Studies on the digestibility of soya bean products, cereals, cereal and plant by-products in diets of dogs. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 33, n. 9, p. 813-822, 1982.
- KNIGHT, A; LIGHT, N. The nutritional soundness of meat-based and plant-based pet foods. **Revista Electronica de Veterinaria**, p. 01-21, 2021.
- KUZMUK, K. N. et al. Diet and age affect intestinal morphology and large bowel fermentative end-product concentrations in senior and young adult dogs. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1940-1945, 2005.

LECHEVALIER, H.; LECHEVALIER, et Mary P. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. In: **Annales de l'Institut Pasteur**. 21 STREET CAMILLE DESMOULINS, ISSY, 92789 MOULINEAUX CEDEX 9, FRANCE: MASSON EDITEUR, 1965. p. 662-+.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL. **REVISTA BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL: REALIDADES E PERSPECTIVAS, MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES**, 2008.

LI, G. et al. Functions and applications of bioactive peptides from corn gluten meal. **Advances in food and nutrition research**, v. 87, p. 1-41, 2019.

LI, Z. et al. Differences in alpha diversity of gut microbiota in neurological diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 879318, 2022.

Lisenko, K.G. **Valor nutricional de farinhas de insetos para cães e gatos**. 2017. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2017.

LOUIS, P. et al. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1197-1208, 2007.

LOUREIRO, B. A. **Avaliação das propriedades nutricionais e funcionais da fibra insolúvel na alimentação de gatos**, 2012. Tese (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal – SP, 2012.

LUMPKINS, B.; BATAL, A.; DALE, N. Use of distillers dried grains plus solubles in laying hen diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 1, p. 25-31, 2005.

MACDONALD, M. L.; ROGERS, Q. R.; MORRIS, J. G. Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore. **Annual review of nutrition**, v. 4, n. 1, p. 521-562, 1984.

MACFARLANE, G. T. et al. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. **FEMS microbiology ecology**, v. 10, n. 2, p. 81-88, 1992.

MÄLKKI, Y.; VIRTANEN, Erkki. Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 34, n. 6, p. 337-347, 2001.

MARTINS, C.F. **Destinações e análise de custo para implantação de usina de produção de etanol**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2018.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p, 2007.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 21, p. 5753-5760, 1968.

MENTSCHER, J.; CLAUS, R. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. **Metabolism**, v. 52, n. 11, p. 1400-1405, 2003.

- MIDDELBOS, I. S. et al. 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**, v. 85, n. 11, p. 3022-3032, 2007.
- MILANEZ, A. Y. et al. A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1921>, 2014
- MILLER, T. L.; WOLIN, M. Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. **The American journal of clinical nutrition**, v. 32, n. 1, p. 164-172, 1979.
- MYINT, H. et al. Effect of soybean husk supplementation on the fecal fermentation metabolites and microbiota of dogs. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 11, p. 1730-1736, 2017.
- NANDI, A. et al. Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, V. 2019, 2019.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dogs and cats. 2nd ed. Washington (DC): National Academy Press. 2006.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.
- NOGUEIRA, B. G. et al. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.
- PACHECO, G. F. E. **Avaliação de complexos enzimáticos sobre o farelo de arroz integral e farinha de penas em dietas para cães**. 2013. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2013.
- PACHECO, P. D. G. **Fontes de amido e fibra solúvel em dietas para cães e seus efeitos no processo de extrusão, qualidade dos kibbles e metabolismo**. 2020. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal – SP.
- PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica chimica acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.
- PEDERSEN, M.B. et al. Xylanase and protease increase solubilization of non- starch polysaccharides and nutrient release of corn-and wheat distillers dried grains with solubles. **Biochemical Engineering Journal**, v.98, p.99-106, 2014..
- QIAN, X. B. et al. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. **Chin. Med. J.** v. 133, p.1844–1855, 2020.
- REINHART, G. D.; SUNVOLD, G. D. In vitro fermentation as a predictor of fiber utilization. In: RECENT advances in canine and feline nutritional research; IAMS INTERNATIONAL NUTRITION SYMPOSIUM, 1996, Ohio. Proceedings... Wilmington, Ohio; Orange Frazer, 1996. p.15-24.

ROLAND, N. et al. Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. **British Journal of Nutrition**, v. 74, n. 2, p. 239-249, 1995.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SARANGI, A. N.; GOEL, A.; AGGARWAL, R. Methods for studying gut microbiota: a primer for physicians. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 9, n. 1, p. 62-73, 2019.

SATO, J. **Estimativa das necessidades de nitrogênio e de aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento**. 2017. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, 2017.

SHIN, Na-Ri; WHON, Tae Woong; BAE, Jin-Woo. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n 9 – 10, p. 916-921, 1999.

SILVA, J. R. **Resíduo seco de destilaria contendo solúveis (DDGS), com e sem xilanase, na alimentação de cães**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

SILVA, J. R.; NETTO, D. P.; SCUSSEL, V. M. Grãos secos de destilaria com solúveis, aplicação em alimentos e segurança—uma revisão. **Pubvet**, v. 10, p. 190-270, 2015.

SILVA, N.E.O.F. **Nutrição do Intestino, imunidade intestinal e resistência a parasitas do intestino em cães**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa – PT, 2009.

ŠKET, R. et al. Hypoxia and inactivity related physiological changes (constipation, inflammation) are not reflected at the level of gut metabolites and butyrate producing microbial community: the PlanHab study. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 250, 2017.

SOKOL, H et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731-16736, 2008.

SOKOL, H. et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731-16736, 2008.

SOUZA, C. M. M. et al. Associação de mananoligossacarídeos e yucca como promotor da saúde intestinal e características fecais de cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 3, p. 15-23, 2017.

- SPIEHS, M. J.; WHITNEY, M. H.; SHURSON, G. C. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota. **Journal of animal science**, v. 80, n. 10, p. 2639-2645, 2002.
- SU, X. Elucidating the Beta-Diversity of the microbiome: from global alignment to local alignment. **Msystems**, v. 6, n. 4, p. e00363-21, 2021.
- SUNVOLD, G. D. et al. Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 1099-1109, 1995.
- SWANSON, K.S., et al. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.3721-3731, 2002.
- TAVERNARI, F. C. et al. Polissacarídeo não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 5, p. 673-689, 2008.
- TJELLSTRÖM, B. et al. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. **Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG**, v. 100, n. 12, p. 2784-2788, 2005.
- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 57, n. 3-4, p. 145-155, 2003.
- TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.
- UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Progress in lipid research**, v. 42, n. 4, p. 318-343, 2003.
- UDOP, União Nacional da Bioenergia. Do etanol ao açúcar. 2020. Disponível em: <<https://www.udop.com.br/noticia/2020/6/9/do-etanol-ao-acucar.html>> . Acesso em: Agosto de 2021.
- WANG, Y; QIAN, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.
- WOLFF, S. P.; GARNER, A.; DEAN, R. T. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends in biochemical sciences**, v. 11, n. 1, p. 27-31, 1986.
- WOOD, P. J. Cereal β -glucans in diet and health. **Journal of cereal science**, v. 46, n. 3, p. 230-238, 2007.
- WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.
- XU, E. et al. Identification of enterotype and its effects on intestinal butyrate production in pigs. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 730, 2021.

- YAMKA, Ryan M. et al. In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal, conventional soybean meal, and low-oligosaccharide low-phytate soybean meal. **American journal of veterinary research**, v. 67, n. 1, p. 88-94, 2006.
- YANG, B; WANG, Y; QIAN, P-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2016.
- YOKOYAMA, M. T. et al. The effects of antibiotics in the weanling pig diet on growth and the excretion of volatile phenolic and aromatic bacterial metabolites. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 1417-1424, 1982.
- ZHU, B.; HE, H.; HOU, T. A comprehensive review of corn protein-derived bioactive peptides: Production, characterization, bioactivities, and transport pathways. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 18, n. 1, p. 329-345, 2019.
- ZIMMERMAN W. Degradation of lignin by bacteria. **J Biotechnol.** v.13, p.199–130, 1980.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) EM DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS.

Artigo formatado de acordo com as normas do *Journal of Animal Science*.

AVALIAÇÃO DO RESÍDUO SECO DA DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) EM DIETA PARA FELINOS DOMÉSTICOS

Mateus P. Santos*, **Flávia M. O. B. Saad***, **Roberto O. Maciel***, **Lucas D. L. Santos***, **Nathalia B. Barreto***, **Maria R. C. Godoy†**.

* Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras. Lavras – Minas Gerais, 37200-90, Brasil

† Department of Animal Science, University of Illinois, Urbana, 61801, USA.

Autor correspondente:

Prof. Dra. Maria Regina Cattai de Godoy

Animal Science Laboratory – University of Illinois at Urbana-Champaign

1207 W. Gregory Dr., Urbana IL, 61801

e-mail: mgodoy2@illinois.edu

Fax: +1 217-300-0226

RESUMO: A fermentação de proteínas no intestino grosso de animais de estimação, cães e gatos, leva a produção de compostos que podem ser nocivos à saúde dos animais, como os ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), fenóis e indóis. Estes compostos estão relacionados com o mau odor das fezes, além de alguns deles em altas quantidades serem tóxicos e estarem relacionados como co-carcinogênicos. Já a fermentação de fibras e carboidratos não digeridos, levam a formação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o butirato, propionato e o acetato, que são fontes de energia para células do intestino e também para o hospedeiro. Sendo assim, objetivou-se avaliar a inclusão do resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS) em dieta para felinos domésticos para avaliar a aceitabilidade, digestibilidade aparente dos nutrientes, produtos de fermentação e microbioma fecal. Os animais foram alimentados durante 20 dias para adaptação, sendo constituído 2 tratamentos, o controle (sem DDGS) e o teste (com DDGS). Para avaliar o ingrediente, foi realizado a metodologia proposta por Matterson et al. (1965), o qual o alimento controle foi substituído em 15% pelo ingrediente teste. Foram utilizados 8 animais/tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. Não foram observadas diferenças

significativas ($p > 0,05$) para aceitabilidade, coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo. Já para matéria orgânica e matéria mineral, ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$). Para os produtos de fermentação, não houve diferença significativa para AGCR total, fenol total e indol total ($p > 0,05$). Para AGCC total ocorreu um aumento no tratamento teste, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). Em relação ao microbioma fecal, não houve diferença significativa entre os tratamentos, ocorreu tendência para o filo *Actinobacteria* ($p < 0,10$) e para o gênero de bactéria *Dialister* teve diferença significativa ($p < 0,05$).

Palavras chaves: produtos de fermentação; gato; microbioma; DDGS.

INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos para animais de estimação tem sido uma preocupação crescente para os proprietários. O Brasil se destaca nesse cenário, sendo um dos principais mercados de alimentos para animais de estimação, com cerca de 25,6 milhões de gatos domésticos (Abinpet, 2021). Associado a demanda por qualidade dos alimentos para animais de companhia, cresce também a preocupação com a competição direta com o alimento humano. Desta forma, a utilização de subprodutos torna-se fundamental, desde que se conheça as características nutritivas do ingrediente e seja uma alternativa segura para a saúde, satisfação animal e segurança alimentar, a utilização de subprodutos é viável e interessante.

Um ingrediente que tem ganhado destaque é o resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS). Este ingrediente tem uma composição rica em proteínas e um perfil interessante de fibras. Atualmente, existem o DDG, DDGS e DDG alta proteína. Apesar de ser um produto promissor, ainda existem poucos trabalhos na literatura que relatam os efeitos desse produto em alimentos utilizados para gatos. Mas há indícios que a utilização desse composto pode melhorar parâmetros relacionados a saúde intestinal, como a qualidade do microbioma (KAELLE et al., 2023).

Uma possível forma de inclusão do DDGS em alimentos para gatos é através da técnica de substituição proposta por Matterson et al. (1965), no qual procedimento consiste em substituir uma porção da dieta padrão por um alimento em teste. A variação na energia metabolizável entre a dieta padrão e a dieta em teste é então

atribuída ao alimento em teste. Esta técnica tem sido essencial para o entendimento da nutrição animal, permitindo aos pesquisadores avaliar com precisão o valor energético dos alimentos e, conseqüentemente, elaborar dietas mais eficientes e nutritivas para os animais.

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o DDGS em dietas para felinos domésticos, com inclusão de 15% sobre um alimento controle. Além de avaliar a dieta, foram avaliados os coeficientes de digestibilidade aparente do ingrediente e a influência sobre os produtos de fermentação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do experimento e instalações

O estudo foi conduzido no CENAC (Centro de Nutrição de Animais de Companhia) na Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras – MG. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da UFLA (protocolo nº 052/21).

Os animais permaneceram em gaiolas individuais de arame galvanizado com 50 x 70 x 60 cm (largura x profundidade x altura, respectivamente), com comedouros e bebedouros em quantidade adequada, área de descanso suspensa além de bandejas sanitárias duplas para a separação das fezes e urina.

Animais, tratamento e delineamento experimental

O teste foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, utilizando 16 gatos adultos, com idade entre 6 e 9 anos, sem raça definida, de ambos os sexos, peso médio de $4,16 \pm 0,26$, alojados individualmente em gaiolas, permitindo a coleta total de fezes e desprezando-se a urina, conforme protocolo da AAFCO (2010). Os animais receberam água *ad libitum* e o alimento controle ou teste em quantidade suficiente para a manutenção de gatos adultos, calculados segundo a equação de predição do NRC (2006) para gatos: $100 \text{ kcal} \times (\text{PC em kg})^{0,67}$. Foi utilizada formulação proposta pela empresa financiadora (PremierPet), sendo que na composição controle não tinha nenhum ingrediente que pudesse interferir nos resultados (prebióticos, fibras solúveis) e a dieta teste foi substituída em 15% pelo ingrediente a ser testado. Os níveis de garantia e a composição básica do produto estão na tabela 1.

O delineamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), o qual consistiu em 2 tratamentos, e cada tratamento possuiu 8 repetições. Foram avaliados dois alimentos, o alimento controle (AC - sem inclusão de DDGS) e o alimento teste (AT - com inclusão de DDGS), o qual foi substituído em 15% do alimento controle. Os animais passaram por período de adaptação de 20 dias, pois além da coleta para digestibilidade, amostras de fezes foram coletadas para análise de produtos da fermentação (indol, fenol, AGCR e AGCC) e microbioma fecal. Estes foram analisados na Universidade de Illinois (USA).

Do dia 1 ao dia 20 do período experimental, as fezes foram descartadas, e a partir do dia 21 até o dia 27 do período experimental, iniciou-se a coleta total de fezes, as quais foram pesadas e armazenadas em freezer -20°C para posterior análise de digestibilidade.

Tabela 1. Níveis de garantia das dietas experimentais

Nutrientes	Controle	Teste
Matéria Seca	96,13	94,17
Proteína Bruta	37,02	39,10
Extrato Etéreo	12,12	13,36
Matéria Fibrosa	3,90	3,29
Matéria Mineral	6,71	7,10

Composição básica alimento controle: farinha de vísceras de aves, milho, quirera de arroz, farelo de glúten de milho 60, óleo de aves, fibra de cana de açúcar, palatabilizante, farinha de torresmo, premix mineral vitamínico, aditivo regulador de acidez, cloreto de potássio, óleo de peixe, adsorvente de micotoxinas, taurina, DL-metionina, cloreto de sódio (sal comum), antioxidante. **Composição básica alimento teste:** farinha de vísceras de aves, milho, quirera de arroz, farelo de glúten de milho 60, resíduo seco da destilaria com solúveis (DDGS), óleo de aves, fibra de cana de açúcar, palatabilizante, farinha de torresmo, premix mineral vitamínico, aditivo regulador de acidez, cloreto de potássio, óleo de peixe, adsorvente de micotoxinas, taurina, DL-metionina, cloreto de sódio (sal comum), antioxidante.

Protocolo experimental, coleta de amostra e análises

Para o protocolo de aceitabilidade, foi acrescido 30% das necessidades diárias de manutenção, conforme recomendação do protocolo do Manual *Pet Food* 9ª Edição (Abinpet – Brasil, 2019). O alimento foi fornecido duas vezes ao dia, sendo metade pela manhã e metade a tarde, e as sobras foram pesadas e anotadas. O protocolo se

iniciou durante o 8º dia do período experimental (pois os animais já haviam passado pela troca gradual) e foi mensurado o consumo durante 5 dias.

Do dia 1 ao dia 20 do período experimental, as fezes foram descartadas, e a partir do dia 21 até o dia 27 do período experimental, iniciou-se a coleta total de fezes, as quais foram pesadas e armazenadas em freezer -20°C para posterior análise de digestibilidade.

As análises bromatológicas dos alimentos e fezes foram realizadas no Laboratório CBO (Valinhos – SP). As metodologias das análises de umidade e voláteis (método 53), proteína bruta (método 45), matéria mineral (método 5) e extrato etéreo por hidrólise ácida (método 12), tiveram como referência o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal 2017. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS) foram calculados pela fórmula:

$$\text{CDA MS}(\%) = [(a-b)/a] \times 100$$

Em que,

a = consumo do alimento na matéria seca

b = excreção de fezes na matéria seca.

Já o CDA dos demais nutrientes, foram calculados pela fórmula:

$$\text{CDA nutriente}(\%) = [(a \times b - c \times d)] / (a \times b) \times 100$$

Em que,

a = consumo do alimento na MS

b = porcentagem do nutriente no alimento

c = excreção de fezes na matéria seca

d = porcentagem do nutriente nas fezes

Com base no resultado das análises, foi determinado os valores do CDA do ingrediente DDGS, por meio da equação proposta por Matterson et al. (1965):

$$\text{CDA ingrediente}(\%) = \text{CDA ac} + \frac{\text{CDA at} - \text{CDA ac}}{p}$$

p

Em que,

CDA ac = CDA do alimento controle

CDA at = CDA do alimento teste

P = porcentagem de substituição do alimento teste.

Para análise de pH urinário, foi medido o volume e mensurado o pH em pHmetro de bancada (modelo DM22 da marca DIGIMED), durante 3 dias.

Para o protocolo de aceitabilidade, foi acrescido 30% das necessidades diárias de manutenção, conforme recomendação do protocolo do Manual *Pet Food* 9ª Edição (Abinpet – Brasil, 2019). O alimento foi fornecido duas vezes ao dia, sendo metade pela manhã e metade a tarde, e as sobras foram pesadas e anotadas. O protocolo se iniciou durante o 8º dia do período experimental (pois os animais já haviam passado pela troca gradual) e foi mensurado o consumo durante 5 dias.

Para análises dos produtos de fermentação, foi utilizado alíquota fecal de 3 g que foi pesada e colocada em um tubo Falcon de 15 mL com ácido clorídrico 2 N e congelada a -20 °C até a análise das concentrações de AGCC, AGCR e amônia. Alíquotas de 2 g foram pesadas em duplicata e colocadas em tubos plásticos de 5 mL para fenóis e indóis e armazenadas a -20 °C até a análise. As análises de produtos fermentativos (AGCC, AGCR, indol e fenol) foram realizadas na Universidade de Illinois, Urbana-Champaign – EUA. As concentrações de AGCC AGCR em amostras de fezes frescas foram determinadas através do uso de cromatografia gasosa de acordo com o método de Erwin et al. (1961) e Goodall e Byers (1978). As concentrações de ácidos graxos voláteis foram determinadas usando um cromatógrafo de gás Hewlett Packard (Hewlett Packard, Avondale, PA) Modelo 5890A equipado com um "detector de ameionização (FID) em uma coluna de vidro (1,8 m x 4 mm i.d.) embalado com GP 10% SP- 1200/1% H3PO4 em 80/100 chromosorb W AW (Supelco, Bellefonte, PA). Nitrogênio era o gás de arraste e tinha uma taxa de fluxo de 45 mL/min. As temperaturas para o forno, porta de injeção e porta do detector foram 125, 175 e 180°C, respectivamente. Foi calculada a média da concentração analisada de cada conjunto de tubos para acetato, propionato, butirato, isobutirato, isovalerato, ácido valerato. As concentrações fecais de fenol e indol foram determinadas por cromatografia gasosa de acordo com o método de Flickinger et al. (2003) com modificações. A análise de fenol e indol utilizou um cromatógrafo gasoso Thermo Scientific TRACE 1300 acoplado a um detector FID (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Uma amostra de 1 µL foi injetada a 220°C, no modo splitless. Uma

coluna Nukol Supelcol (60 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro) com uma espessura de 0,25 µm foi usada para separar os compostos fenólicos. A temperatura do forno foi inicialmente de 150°C que foi mantida por 1 min, e então foi aumentada a 25°C por minuto para 200°C e mantida por 35 min. O padrão interno utilizado foi o 5-metilindol, e todas as amostras foram analisadas em duplicata. As concentrações de amônia foram medidas de acordo com o método de Chaney e Marbach (1962).

Além disso, alíquotas de fezes foram congeladas e mantidas a -80°C, para determinação do microbioma fecal. As fezes eram coletadas em no máximo 15 minutos após os animais defecarem. A extração do DNA fecal foi feita utilizando o kit comercial Mo-Bio PowerSoil (MO 204 BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América). A concentração de DNA foi determinada pelo fluômetro Qubit® 2.0 (Life technologies, Grand Island, Nova York, Estados Unidos da América). Os iniciadores moleculares progressivos (primer-sense/forward - 515F; 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e reverso (primer anti-sense/ reverse - 806R; 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') que visam a um fragmento de 291 pb da região v4 foram utilizados, para amplificação (IDT Corp., Coralville, Iowa, Estados Unidos da América) (Caporaso et al., 2012) do gene rRNA 16S, usando a técnica Fluidigm Access Array (Fluidigm Corporation, South San Francisco, Califórnia, Estados Unidos da América) em combinação com Roche High Fidelity Fast Start Kit (Roche, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos da América).

A qualidade dos amplicons foi avaliada usando um analisador de fragmentos (Advanced Analytics, Ames, Iowa, Estados Unidos da América) para confirmar as regiões e os tamanhos dos amplicons. Quantidades equimolares dos amplicons de cada amostra foram misturadas e os tamanhos dos amplicons foram selecionados em um E-gel de agarose a 2% (Life technologies, Grand Island, Nova York, Estados Unidos da América) sendo extraídos com o kit de purificação de gel Qiagen (Qiagen, Valencia, Califórnia, Estados Unidos da América).

O sequenciamento, utilizando plataforma Illumina, foi realizado em um sequenciador MiSeq, usando reagentes v3 (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América) no Centro de Biotecnologia da Universidade de Illinois. As tags Fluidigm foram removidas usando FASTX-Toolkit (versão 0.0.14), e QIIME 1.9.1 software foi usado para processar os dados de sequência resultantes (Caporaso et al., 2010). Sequências de alta qualidade (valor de qualidade ≥ 20) foram demultiplexadas. As sequências foram então agrupadas em unidades taxonômicas

operacionais (OTU), usando a seleção OTU de referência aberta contra o banco de Greengenes com um nível de similaridade de 97%. Singletons (OTUs que foram observados menos de 2 vezes) e OTUs que representarão menos de 0,01% foram descartados. A análise das coordenadas principais (PCoA) foram realizadas, usando distâncias métricas de fração únicas ponderadas e não ponderadas (UniFrac) (Ley et al., 2005).

Para avaliar os parâmetros redox (glutaciona reduzida, enzima glutaciona transferase, enzima catalase, peroxidação lipídica e enzima superóxido dismutase), foi coletado o sangue dos 16 animais (aproximadamente 10 mL). Após a coleta, foi colocado em eppendorf de 2mL e centrifugados em centrífuga refrigerada (modelo Microfuge 20R da marca Beckman Coulter) a 5000g durante 4 minutos, para separar soro e plasma. O plasma foi separado e colocado em novo eppendorf e congelado em gelo seco para transporte e posterior análise. Foi necessário coletar 2 mL de plasma para análise das enzimas e parâmetros oxidativos e guardar contra prova. As amostras foram mantidas refrigeradas (2 - 4°C) até a centrifugação. As enzimas foram analisadas pelo laboratório Imunova – Análises Biológicas (Curitiba – PR).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas (para parâmetros redox), foram feitas divididas em amostras que tiveram distribuição normal, onde foram submetidas a análise estatística T de forma não pareada, e as que não tiveram distribuição normal, foram submetidas ao Teste Mann-Whitney para análise não pareada.

Já para os parâmetros de digestibilidade, produtos de fermentação, aceitabilidade, escore fecal, volume e pH urinário, utilizou-se Robustreg para verificar se tinha outliers. Posteriormente, foi realizado o Teste de Shapiro Wilk para ver se os dados estavam normais, e após isso seguiu para o teste de Análise de Variância (ANOVA). Todos os testes são significativos quando $P < 0,05$.

Para os dados de microbioma fecal, foi realizado teste de ANOVA para ver havia diferença estatística entre os tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aceitabilidade, Digestibilidade e pH urinário

A FEDIAF (2020) preconiza no mínimo 70% de ingestão do alimento, de acordo com as necessidades energéticas do animal. Sendo assim, de acordo com os valores

encontrados para o teste de aceitabilidade, percebe-se que os tratamentos obtiveram valor de ingestão acima do mínimo preconizado. Portanto, tanto o alimento controle quanto o teste apresentaram aceitação acima do estipulado dentro do aceitável, conforme tabela 2.

Tabela 2. Consumo em relação a necessidade energética (100 kcal x PC^{0,67})

Item	Controle	Teste	EPM	p-Valor
Aceitabilidade (%)	78,29	78,23	4,38	0,1052

Na literatura, encontra-se uma quantidade maior de estudos, nos quais os pesquisadores testaram a inclusão do DDGS em cães. Por exemplo, Silva (2016), avaliaram 4 níveis de inclusão do DDGS em dieta para cães (0, 6, 12 e 18%), com e sem enzima (xylanase), e no teste de palatabilidade (primeira escolha vs. preferência), foi encontrado diferença estatística no teste 0 e 18%, no qual os animais tiveram preferência pela dieta contendo 18%. Em nosso estudo, apesar de não haver níveis de inclusão e apenas uma substituição (15%), não houve diferença estatística entre o alimento controle e o alimento teste, o que é desejável.

Risolia et al., (2019) avaliaram a inclusão de 0 e 20% de DDGS em dieta para cães e em relação a palatabilidade (primeira escolha e consumo), não observaram interferência na primeira escolha, porém os animais ingeriram maior quantidade da dieta sem inclusão de DDGS ($p < 0,05$). Kaelle et al., (2023) avaliaram a inclusão de 4 níveis de DDG alta proteína (HPDDG), 0, 7, 14 e 21%, em dieta para cães, e no teste de palatabilidade compararam as dietas 0 vs. 7 e 0 vs. 21, onde os animais preferiam a dieta com 21% de inclusão do HPDDG.

Percebe-se que existe uma contradição em relação aos efeitos DDGS quanto a aceitação em trabalhos realizados com cães. Entretanto, estudos onde encontra-se dados sobre aceitação da inclusão de DDGS em dietas secas para gatos são escassos. Portanto, este trabalho fornece informações importantes sobre a aceitação deste produto. No mais, mais pesquisas são necessárias para elucidar a relação da aceitabilidade em dietas de carnívoros domésticos.

Já para o teste de digestibilidade, também não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para proteína bruta, matéria seca e extrato etéreo por hidrólise ácida. Houve diferença para matéria mineral e matéria orgânica, conforme tabela 4 e figura 4. Além desses parâmetros, foi avaliado também os coeficientes de digestibilidade aparente

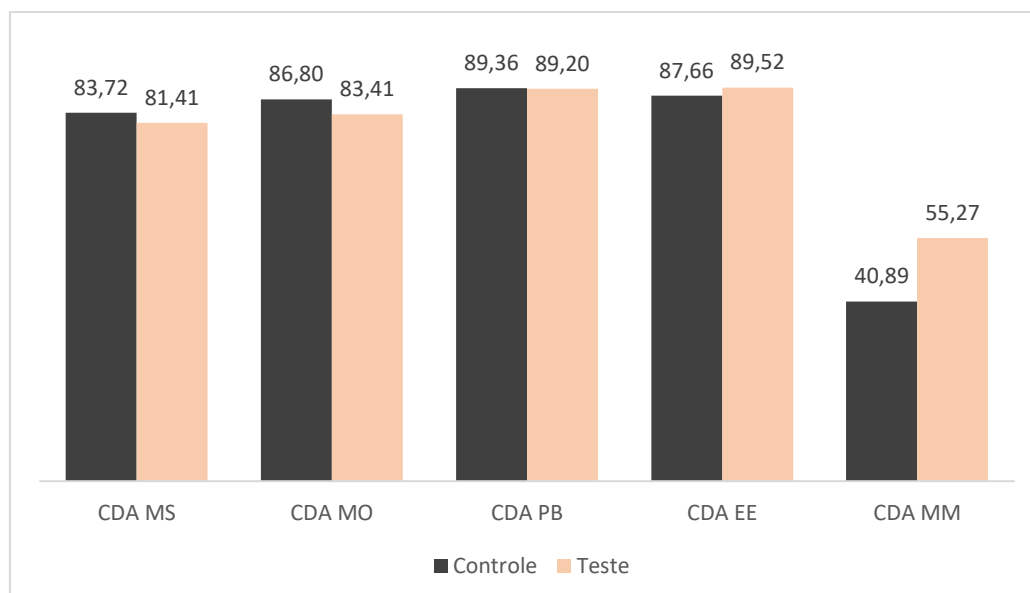
do ingrediente e escore fecal (não apresentou diferença estatística), conforme tabela 3.

Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente das dietas experimentais, do ingrediente e escore fecal

Item	Controle	Teste	EPM	p-Valor
Coeficiente de digestibilidade aparente (%)				
Matéria Seca	83,72	81,41	0,73	0,134
Matéria Orgânica	86,80	83,41	0,73	0,021
Proteína Bruta	89,36	89,20	0,59	0,896
Extrato Etéreo Hidrólise Ácida	87,66	89,52	0,77	0,775
Matéria Mineral	40,89	55,27	2,71	0,004
Escore fecal	3,87	3,71	0,05	0,089
Coeficiente de digestibilidade aparente do DDGS*				
Matéria Seca	-	68,29	-	-
Matéria Orgânica	-	64,16	-	-
Proteína bruta	-	88,27	-	-
Extrato Etéreo Hidrólise Ácida	-	100,00	-	-
Matéria Mineral	-	100,00	-	-

*Calculado através do método de substituição de Matterson et al. (1965)

Figura 1. Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) das dietas controle e teste (inclusão do DDGS), em gatos.



No mesmo estudo realizado por Silva (2016), eles avaliaram a digestibilidade aparente do ingrediente e obtiveram redução linear da digestibilidade matéria seca, matéria orgânica, extrato etéreo, energia bruta e energia metabolizável. Apenas para o tratamento sem enzima houve redução da proteína bruta. Em nosso estudo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para matéria orgânica e matéria mineral.

Em relação aos coeficientes de digestibilidade aparente do ingrediente, a matéria mineral e extrato etéreo por hidrólise ácida apresentaram valores de 100%. Esse fato pode ser justificado porque ambos os níveis do alimento são maiores do que do ingrediente e quando faz metodologia proposta por Matterson (1965), os erros analíticos dentro do desvio permitido levam a estas discrepâncias, considerando 100% de absorção de ambos.

Kaelle et al., (2023) avaliaram a inclusão de DDG alta proteína (HPDDG) em dieta para cães, utilizando a mesma metodologia deste estudo, em substituição de 30% da dieta controle. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) do ingrediente foi de 91,2% para proteína bruta (PB), 85,5% para matéria seca (MS) e 84,6% para extrato etéreo hidrólise ácida (EEHA). Esses resultados são similares ao encontrados no presente estudo para PB e EEHA. Silva et. al., (2016) calcularam o CDA do ingrediente pelo método de regressão em dieta para cães, obtendo resultados de CDA da PB em 76,7%, EEHA em 63,3% e MS em 59,0%, valores estes que diferem dos encontrados no presente estudo. Allen et al., (1981) avaliaram inclusão de 3 níveis de DDGS em dieta para cães (0, 13,1 e 26,1%) e obtiveram redução na digestibilidade da proteína bruta com inclusão de 26,1%.

Os parâmetros de digestibilidade e aceitabilidade não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, e isso era o desejável, pois além da composição interessante e os resultados obtidos, a inclusão de DDGS pode baratear o custo de formulação. Sendo assim, a inclusão de DDGS em até 15% para gatos não levou a interferência na aceitação e digestibilidade pelos animais.

Para volume e pH urinário, houve diferença significativa apenas para o volume urinário, conforme tabela 4. O pH urinário não ter alteração também é desejável, visto que para manter trato urinário saudável de felinos saudáveis, o pH deve estar em uma faixa de 6,2 – 6,6. O DDGS possui alta quantidade de metionina, o que pode ter levado a uma redução do pH, mesmo sem diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 4 - Volume e pH urinário

Item	Controle	Teste	EPM	p-Valor
Volume urinário (mL)	41,67	59,05	3,48	0,006
pH urinário	6,30	6,18	0,04	0,167

Enzimas relacionadas ao status antioxidante

Já para as enzimas quantificadas para avaliação de status antioxidante, glutatona reduzida (GSH), glutatona S-Transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e a taxa de peroxidação lipídica (LPO), não foram encontradas diferenças significativas, mas houve tendência para atividade da enzima catalase, conforme tabela 5.

Tabela 5 - Quantificação de enzimas do status antioxidante

Item	Controle	Teste	EPM	p-Valor
GSH pmol.mL ⁻¹	14,45	16,81	2,91	0,487
GST μmol.min ⁻¹ .μL ⁻¹	59,79	28,31	11,60	0,116
CAT nmol.min ⁻¹ .μL ⁻¹	0,28	0,04	0,07	0,053
SOD U.μL ⁻¹	1,35	1,32	0,02	0,243
Taxa de peroxidação lipídica				
LPO nmol.min ⁻¹ .μL ⁻¹	1,49	1,41	0,08	0,572

As espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamados de radicais livres, são exemplos de substâncias oxidantes que são formadas pelo organismo em condições fisiológicas (DAENEN et al., 2018). Desta forma, podem ser classificados com EROs: O₂⁻ (ânion superóxido), H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), radicais hidroxila (·OH) e radicais alcóxi (RO).

As reações que ocorrem no complexo I (NADH desidrogenase) e complexo III (ubiquinona-citocromo redutase) da cadeia transportadora geram a formação de superóxido (O₂⁻) devido ocorrer a transferência de elétrons diretamente para o oxigênio. O peróxido de hidrogênio é formado pela ação da enzima endógena superóxido dismutase (SOD). Ela atua sobre o O₂⁻ no processo chamado desmutação, no qual converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e O₂.

Posteriormente o peróxido de hidrogênio é transformado em água por ação de outras enzimas (BAFANA et al., 2011).

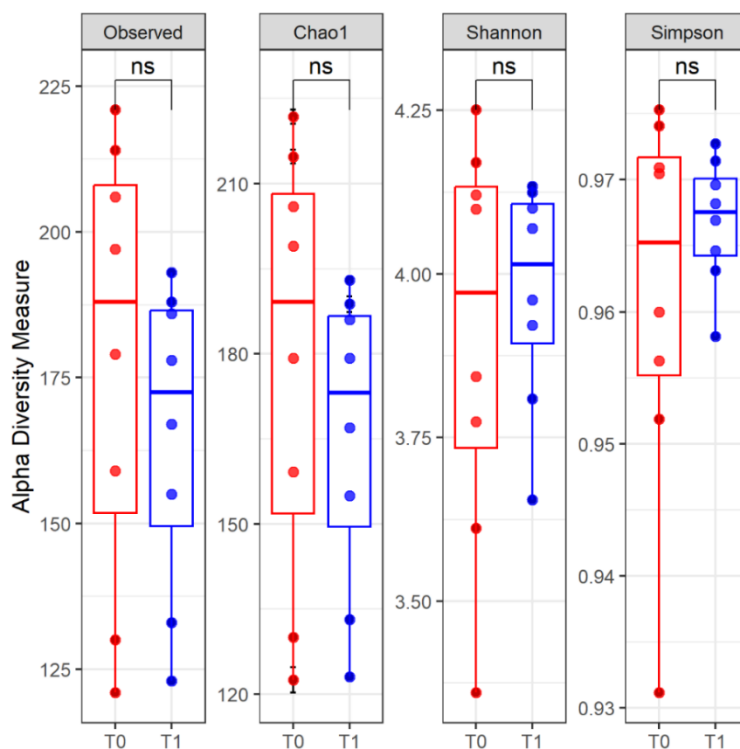
A catalase, composta por quatro cadeias polipeptídicas, reage com o H_2O_2 e tem a taxa de renovação mais alta entre todas as enzimas antioxidantes. Ela decompõe o H_2O_2 através de atividade catalítica e peroxidática (ADWAS et al., 2019). Portanto, ao constatar um aumento da atividade enzimática da catalase, espera-se o mesmo aumento na atividade da SOD, uma vez que esta produz o H_2O_2 que é substrato para a catalase. Como essa situação não ocorreu nos resultados encontrados neste trabalho, acredita-se que a tendência encontrada para catalase é uma inconsistência analítica. Logo, a substituição de 15% do DDGS, neste ensaio não alterou as enzimas antioxidantes testadas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Hu et al., (2020) que avaliaram a concentração plasmática de antioxidantes em frangos de corte alimentados com níveis de inclusão de DDGS e DDGS hidrolisado com enzima Alcalase (4 e 8%). Em relação as diferentes inclusões, não houve diferença significativa. Já em comparação ao grupo controle, frangos alimentados sem DDGS (com ou sem enzima), houve diferença significativa, no qual os animais alimentados com DDGS tiveram maior atividade antioxidante.

Microbioma fecal

O microbioma fecal dos felinos, analisado por sequenciamento do gene 16S rRNA (3.668.128 sequências de 16S rRNA de alta qualidade variando de 62.547 a 98.901 sequências por amostra, média de 83.366,54) foram obtidas após análises de controle de qualidade e filtragem OTU.

Figura 2 – Comparação dos parâmetros de diversidade alfa entre os tratamentos estudados. *Box-plots* dos valores observados, índice de Chao1, índice de Shannon e índice de Simpson de diversidade alfa. Fonte: Autor (2023).



Legenda: T0: Dieta controle; T1: dieta teste (DDGS).

Na figura 2 é possível verificar a comparação dos parâmetros de diversidade alfa entre os tratamentos estudados (*box-plots* dos valores observados, índice de Chao1, índice de Shannon e índice de Simpson de diversidade alfa). A diversidade alfa se refere à variedade de espécies presentes em uma única amostra ou ambiente. Ela representa tanto a quantidade (número de espécies) quanto a uniformidade (distribuição das espécies) da microbiota em um determinado local, como, por exemplo, o intestino de um único indivíduo.

Uma elevada diversidade alfa, como encontrada neste ensaio, geralmente denota um estado de equilíbrio eubiótico, indicando uma comunidade microbiana abundante e equilibrada, capaz de enfrentar perturbações e desempenhar suas funções metabólicas e imunológicas de forma eficiente (GONG et al., 2016; LI et al., 2022).

Com relação a abundância relativa dos filos bacterianos encontrados, percebe-se que o filo *Firmicutes* é o com maior número de indivíduos, sendo 65,4% no tratamento controle e 68,2% no tratamento teste. Logo depois, os filos *Actinobacteriota* (T0: 20,5% e T1: 12,8%) e *Bacteroidota* (T0: 9,3% e T1: 13,6%),

sendo que os demais filos (*Campilobacterota*, *Proteobacteria*, *Fusobacteriota*, *Desulfobacterota*, *Deferribacterota*). Esses resultados corroboram com Jha et al. (2020), que analisou o microbioma de 93 gatos e constatou que os filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroides* constituíram, respectivamente, 38%, 37% e 14% de as bactérias intestinais em gatos. Deng e Swanson (2015) também identificaram os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* como sendo os filos predominantes em gatos saudáveis.

Apesar dos tratamentos testados (T0 e T1), não foi constatado diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os filos bacterianos avaliados. Porém, houve tendência para os filos *Actinobacteriota* e *Desulfobacterota* ($p = 0,083$ e $p = 0,082$, respectivamente) (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise descritiva da abundância relativa (%) dos grupos controle e teste nos diferentes filos de bactérias.

Filos	Tratamentos		p-Valor
	Controle (T0)	Teste (T1)	
<i>p__Firmicutes</i>	65,40	68,20	0,328
<i>p__Actinobacteriota</i>	20,52	12,81	0,083
<i>p__Bacteroidota</i>	9,26	13,57	0,279
<i>p__Campilobacterota</i>	1,99	0,40	0,878
<i>p__Proteobacteria</i>	1,75	3,51	0,130
<i>p__Fusobacteriota</i>	0,07	1,30	0,279
<i>p__Desulfobacterota</i>	0,96	0,17	0,082

Fonte: Autor (2023).

Percebe-se que com a adição do DDGS (T1) há uma tendência há redução de representantes do filo *Actinobacteriota*. Fato que pode ser importante pois este filo engloba gêneros que apresentam efeito benéfico para a saúde intestinal dos animais (BURAKOVA et al., 2022), como por exemplo, *Collinsella* e *Eggerthella* (ZHONG et al., 2022). Essa tendência pode ser explicada pela característica nutricional do DDGS, que se caracteriza como uma fonte de fibra insolúvel (PEDERSEN et al., 2014) com alto nível de proteína (SPIEHS et al., 2002). Sendo assim, os gêneros bacterianos que utilizam como substratos fibras mais fermentáveis no filo *Actinobacteriota*, como por exemplo as bactérias do gênero *Bifidobacterium* (PRECUP; DAN-CRISTIAN, 2019; YOON et al., 2023), podem ter sentido a alteração do ambiente intestinal devido a adição de um alimento com fibras insolúveis.

O filo *Desulfobacterota*, apresenta como representantes que são bactérias anaeróbias e redutoras de sulfato (XU et al., 2023). Encontra-se neste filo as famílias *Enterobacteriaceae* e *Victivallaceae* e os gêneros *Parasutterella* e *Slackia* (RODZIEWICZ; SZEWCZYK; BRYL, 2024). Na literatura, é relatado que os representantes desse filo atuam de maneira pró-inflamatória causando efeitos deletérios no intestino. (RODZIEWICZ; SZEWCZYK; BRYL, 2024). No presente estudo, foi demonstrado que a dieta que contém DDGS causou uma tendência redução de representantes deste filo nas fezes de gatos. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato da fibra poder se ligar e carrear componentes da dieta como os sulfatos, substrato das bactérias presentes nesse filo.

Tabela 7 – Análise descritiva da abundância relativa (%) dos grupos controle – T0 e teste – T1 nos diferentes gêneros de bactérias.

Gêneros	Tratamentos		p-Valor
	Controle (T0)	Teste (T1)	
<i>g__Bacteroides</i>	4,85	4,71	1,000
<i>g__Blautia</i>	7,88	7,40	0,442
<i>g__Catenibacterium</i>	4,53	6,26	0,161
<i>g__Collinsella</i>	10,72	8,70	0,505
<i>g__Dialister</i>	2,84	5,90	0,021
<i>g__Holdemanella</i>	3,94	5,99	0,105
<i>g__Megasphaera</i>	6,81	5,80	1,000
<i>g__Peptoclostridium</i>	5,84	7,60	0,234
<i>g__Solobacterium</i>	6,25	4,84	0,442
<i>g__Subdoligranulum</i>	4,16	3,56	0,574
Others	42,15	39,24	0,382

Fonte: Autor (2023).

Com relação a frequência relativa dos gêneros de encontrados nas fezes dos gatos, foi encontrado diferença significativa apenas para o gênero *Dialister* ($p = 0,021$), um gênero representante do filo Firmicutes. Sendo a maior quantidade de bactérias deste gênero encontrada no tratamento T1 (5,90%) em comparação ao T0 (2,84%). Sabe-se que algumas espécies englobadas no gênero *Dialister* apresentam função importante no metabolismo de glicose, além disso é considerado um gênero não fermentativo, com cepas assacarolíticas (ZHANG et al., 2017). Bactérias correlacionadas a este gênero geralmente são encontradas cavidade oral,

periodontite, abscessos cerebrais, bacteremia de origem vaginal e fezes humanas (CONTRERAS et al., 2000; ROUSÉE et al., 2002; PIERRE; DUBREUIL; LEVY et al., 2006; MOROTOMI et al., 2008; ZHANG et al., 2017).

Em um estudo realizado *in vitro*, foi observado que a goma guar proporcionou significativamente aumento de bactérias do gênero *Dialister*. Neste estudo, pesquisadores observaram o efeito de diferentes tipos de fibra sobre a microbiota fecal e na produção de AGCC em amostras fecais humanas (YANG et al., 2013). Vale ressaltar que a goma guar obteve menor grau de fermentabilidade no estudo em questão ($p < 0.05$), o que pode que essa bactéria utilize como substrato, produtos com fermentabilidade baixa a moderada, similar as características do DDGS.

Em outro estudo, também *in vitro*, foi observado o aumento de bactérias do gênero *Dialister* quando foi inoculado ácido ferúlico na solução (GONG et al., 2019). Neste estudo, os pesquisadores perceberam uma correlação negativa entre os representantes desse gênero com o pH, e uma correlação positiva com a produção de ácido acético, propionico e butirico. O aumento de bactérias do gênero em questão, também demonstrou correlação positiva com a diminuição plasmática de interleucina 6, componente pro-inflamatório, em humanos (MARTÍNEZ et al., 2012). Portanto, este gênero está relacionado a melhoras de parâmetros relacionados a saúde intestinal e imunológica dos indivíduos.

Produtos de fermentação (AGCC, AGCR, fenol, indol e amônio)

Para as concentrações de AGCC, houve diferença significativa entre os tratamentos e o propionato foi o único dos AGCC que apresentou significância entre eles (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV) ($\mu\text{mol/g}$)

Item	Controle	Teste	EPM	p-Valor
Acetato	173,78	214,89	13,60	0,136
Propionato	69,38	123,18	9,55	0,001
Butirato	68,11	54,81	7,65	0,627
AGCC	301,36	392,88	23,58	0,048
Isobutirato	7,35	5,35	0,54	0,066
Valerato	35,10	31,43	3,26	0,598

Isovalerato	13,19	10,28	0,93	0,128
AGCR	47,69	47,06	3,32	0,928

Na literatura encontra-se relatos que bactérias do gênero *Dialister*, que foram significativamente maiores no tratamento com DDGS, proporcionaram aumento de AGCC com concomitante diminuição do isobutirato. Os pesquisadores realizaram um ensaio *in vitro*, com fezes humanas (GONG et al., 2019). No presente estudo encontrou-se resultados semelhantes, com aumento de AGCC, principalmente propionato, e uma tendência a diminuição de isobutirato o que também aconteceu nesse estudo.

Como já relatado nesse estudo, a bactérias do gênero *Dialister*, são consideradas não fermentativas, contudo, elas podem atuar de forma indireta na produção de AGCC. Por exemplo, essas bactérias podem degradar substratos complexos, liberando metabólitos que podem ser utilizados por outros membros da microbiota intestinal para produzir AGCCs. O propionato é utilizado como substrato da gliconeogênese (BLOEMEN et al., 2010; BYRNE et al., 2015), auxilia na redução do consumo através do estímulo para secreção do GLP-1 e é fonte de energia para o hospedeiro (NRC, 2006), portanto o DDGS pode ser considerado um ingrediente que pode auxiliar na saúde de gatos.

Outros trabalhos apoiam os resultados obtidos através deste estudo, Risolia et al., (2019) ao avaliarem a inclusão de DDGS em dieta para cães, verificaram aumento da concentração de AGCC, principalmente de ácido acético e propiônico. Silva et al., (2016) também avaliaram dieta para cães contendo DDGS, e verificaram aumento na produção de AGCC. Ambos os estudos verificaram redução no pH fecal, indicando um possível efeito prebiótico. Corroborando com estes estudos, Kawauchi et al., (2011) atribui esse possível efeito devido aumento dos AGCC, o que vai de encontro com os resultados do presente estudo. Sendo assim, a inclusão do DDGS para gatos também pode ser um indicativo de efeito prebiótico.

Tabela 9. Concentrações de fenol, indol e amônio ($\mu\text{mol/g}$)

Item	Controle	Teste	EPM	p-Valor
Fenol	0,13	0,15	0,09	0,108
4-MetilFenol	1,40	1,25	0,09	0,354
4-EtilFenol	0,96	1,72	0,19	0,044

Total Fenol	2,08	3,12	0,28	0,062
Amônio	113,41	89,04	6,98	0,080
Indol	0,58	0,47	0,09	0,630
7-MetilIndol	0,36	0,26	0,03	0,272
3-MetilIndol	0,16	0,15	0,02	0,830
2,3-DimetilIndol	0,17	0,11	0,01	0,691
Total Indol	1,02	0,70	0,09	0,084

Em relação aos compostos putrefativos, fenóis, indóis, amônio e AGCR, que são produtos gerados à partir da fermentação de proteínas e tem potencial de gerar doenças, houve diferença significativa entre os tratamentos para o 4-EtilFenol e três tendências relacionadas ao isobutirato (Tabela 8), fenol total, a concentração fecal de amônio (Tabela 9).

Quando fermentados, os compostos nitrogenados, tanto endógenos, quanto não digeridos, produzem substâncias que aumentam o odor fecal e estão relacionados a inflamação. Englobam-se dentro dessas substâncias amônia, aminas alifáticas, ácidos graxos ramificados (como isobutirato e isovalerato), fenóis (como fenol, p-cresol e 4-etilfenol), indóis (como indol, 3-metilindol, 2-metilindol, 2,3-metilindol e 2,5-metilindol) e compostos sulfurados voláteis (FLICKINGER et al., 2003; KUZMUK et al., 2005).

Em relação a maior presença de compostos fenólicos (4-EtilFenol [$p=0,044$] e fenol total [$p=0,62$]) para o tratamento com a inclusão do DDGS, hiposteniza-se que este produto, que possui alto nível proteico, pode ter gerado aumento da proteína não digerida no intestino grosso. Logo, aumentando substrato para bactérias proteolíticas gerando o aumento dos níveis encontrados.

Apesar do aumento dos compostos fenólicos, o DDGS também proporcionou redução do isobutirato (Tabela 8), um AGCR, e uma tendência a redução do amônio (Tabela 9). Tais compostos aumentam o odor fecal, então a sua redução é uma característica benéfica atribuída a adição do DDGS. Uma possível explicação para a diminuição destes compostos está relacionada há um possível ambiente desfavorável para as bactérias fermentadoras dos aminoácidos que geram AGCR e amônio. Os resultados obtidos em relação ao AGCC (Tabela 8), auxiliam na elucidação desta hipótese, uma vez que, sabe-se que a maior presença de AGCC,

como a encontrada para o T1 (DDGS), diminui o pH intestinal, o que dificulta a proliferação de microrganismos proteolíticos (EPHRAM et al, 2020).

Portanto, apesar do DDGS ser um ingrediente com alto teor proteico, a fermentação intestinal da sua porção fibrosa, pode proporcionar um ambiente intestinal favorável a produção de AGCC, e desfavorável para a produção de AGCR e amônio. Contudo, o teor proteico ainda pode influenciar o nível de produção dos compostos fenólicos

CONCLUSÃO

Com o presente estudo é possível concluir que o DDGS não afetou os resultados de digestibilidade aparente dos nutrientes. Além disso, a dieta com DDGS, causou aumento significativo de um gênero de bactérias benéficas para saúde intestinal. O que refletiu em uma quantidade maior de AGCC, e diminuição de AGCR e amônio. Com isso, as evidências do presente estudo mostram que essa fonte proteica, no nível de inclusão testado, é seguro e adequado para inclusão em formulações para gatos adultos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ADWAS, A. A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*, v. 6, n. 1, p. 43-47, 2019.
- ALLEN, S.E.; FAHEY, G.C.; CORBIN, J.E.; PUGH, J.E.; FRANKLIN, R.A. Evaluation of byproduct feedstuffs as dietary ingredients for dogs. *Journal of Animal Science*.v.53, n.6, p.1537-1544.1981.
- AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, Serpedin E, Suchodolski JS. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017 Nov 1;93(11). doi: 10.1093/femsec/fix136. PMID: 29040443.
- Association Brazilian of The Pet Products Industry. (ABINPET). *Pet Food Brazil Manual*. 2019. Available: <https://abinpet.org.br/manual-pet-food-brasil-10-edicao/>. Accessed: 30 nov. 2021.
- BAFANA, A., et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 2, p. 129-138, 2011.
- BLOEMEN, J. G. et al. Short chain fatty acids exchange: Is the cirrhotic, dysfunctional liver still able to clear them? *Clinical Nutrition*, v. 29, n. 3, p. 365-369, 2010.

- BURAKOVA, I., et al. The effect of short-term consumption of lactic acid bacteria on the gut microbiota in obese people. *Nutrients*, v. 14, n. 16, p. 3384, 2022.
- BYRNE, C. et al. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, v. 39, n. 9, p. 1331-1338, 2015.
- Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, and J. I. Gordon. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7(5)335-336.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130–132. doi:10.1093/clinchem/8.2.130
- CONTRERAS, A., et al. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000.
- Corsato Alvarenga I, Aldrich CG. The effect of sorghum fractions on apparent total tract digestibility and antioxidant capacity by dogs. *PLoS One.* 2018 Oct 26;13(10):e0206090. doi: 10.1371/journal.pone.0206090. PMID: 30365541; PMCID: PMC6203353.
- DAENEN, K., et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology*, v. 34, p. 975-991, 2019.
- EPHRAIM, E.; COCHRANE, C.-Y.; JEWELL, D. E. Varying protein levels influence metabolomics and the gut microbiome in healthy adult dogs. *Toxins*, v. 12, n. 8, p. 517, 2020.
- Erwin, E., G. Marco, and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44(9):1768-1771.
- Fahey. 2003. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *J. Anim. Sci.* 81(8):2008-2018.
- FLICKINGER, E. et al. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Science*, v. 81, n. 8, p. 2008-2018, 2003.
- Flickinger, E., E. Schreijen, A. Patil, H. Hussein, C. Grieshop, N. Merchen, and G. Gao, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45 (1998) 41-45.
- GONG, J., et al. Lack of short-chain fatty acids and overgrowth of opportunistic pathogens define dysbiosis of neuromyelitis optica spectrum disorders: a Chinese pilot study. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 25, n. 9, p. 1316-1325, 2019.
- GONG, Lingxiao et al. Feruloylated oligosaccharides modulate the gut microbiota in vitro via the combined actions of oligosaccharides and ferulic acid. *Journal of Functional Foods*, v. 60, p. 103453, 2019.

Hu, R. et al. Antioxidant performances of corn gluten meal and DDGS protein hydrolysates in food, pet food, and feed systems. 2020. *Journal of Agriculture and Food Research*.

JHA, A.R., et al. Characterization of gut microbiomes of household pets in the United States using a direct-to-consumer approach. *PLoS One*, v. 15, n. 2, p. e0227289, 2020.

Kaelle, G. C. B. et al., High-protein dried distillers grains in dog diets: diet digestibility and palatability, intestinal fermentation products, and fecal microbiota, *Journal of Animal Science*, Volume 101, 2023, skad128, <https://doi.org/10.1093/jas/skad128>

Kawauchi IM, Sakomura NK, Vasconcellos RS, de-Oliveira LD, Gomes MOS, Loureiro BA, Carciofi AC (2011) Digestibility and metabolizable energy of maize gluten feed for dogs as measured by two different techniques. *Journal of Animal Feed Science and Technology* 169:96-103.

KUZMUK, K. N. et al. Diet and Age Affect Intestinal Morphology and Large Bowel Fermentative End-Product Concentrations in Senior and Young Adult Dogs. *The Journal of Nutrition*, v. 135, p. 1940-1945, 2005.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 102, n. 31, p. 11070- 11075, Aug. 2005.

LI, Q., et al. Nutritional strategies to alleviate oxidative stress in sows. *Animal Nutrition*, v. 9, p. 60-73, 2022.

LI, Z., et al. Differences in alpha diversity of gut microbiota in neurological diseases. *Frontiers in Neuroscience*, v. 16, p. 879318, 2022.

LIU, S. et al. Sodium butyrate reduces ammonia production in the cecum of laying hens by regulating ammonia-producing bacteria. *Poultry Science*, p. 102241, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102241>.

MARTÍNEZ, Inés et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *The ISME journal*, v. 7, n. 2, p. 269-280, 2013.

MATTERSON, L.D.; POTTER, L.M.; STUTZ, M.W.; SINGSEN, E.P. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. Storrs, Connecticut, The University of Connecticut, Agricultural Experiment Station, 1965, 11p.(Research Report, 7).

MIDDELBOS, I. et al. 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*, v. 85, n. 11, p. 3022-3032, 2007.

Minamoto, Y., T. Minamoto, A. Isaiah, P. Sattasathuchana, A. Buono, V. R. Rangachari, H. I. Mcneely, J. Lidbury, J. M. Steiner, and J. S. Suchodolski. 2019. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *J. Vet. Intern. Med.* 33:1608– 1618. doi: 10.1111/jvim.15520.

MOROTOMI M.; Nagai, F.; Sakon, H.; Tanaka, R. *Dialister succinatiphilus* sp. nov. and *Barnesiella intestinihominis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:2716–20.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I.; GOKDOGAN, S. The impact of natural clinoptilolite on ammonia, cadaverine and other polyamine formation by food-borne pathogen in lysine decarboxylase broth. *LWT-Food Science and Technology*, v. 65, p. 703-710, 2016.

PIERRE, L. J.; Dubreuil, L.; Levy, J. Isolation of *Dialister pneumosintes* isolated from a bacteremia of vaginal origin. *Anaerobe.* 2006.

Precup, G., and Vodnar, D. C. 2019. Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *British Journal of Nutrition*, 122(2): 131-140. doi:10.1017/S0007114519000680

Risolia, L. W. et al. Effects of adding dried distillers grains with solubles (DDGS) to dog diets supplemented with xylanase and protease. 2019. *Revista Brasileira de Zootecnia.* <https://doi.org/10.1590/rbz48201901124>

RODZIEWICZ, A; SZEWCZYK, A; BRYL, E. Gluten-Free Diet Alters the Gut Microbiome in Women with Autoimmune Thyroiditis. *Nutrients*, v. 16, n. 5, p. 685, 2024.
ROUSÉE, J. M. et al. *Dialister pneumosintes* associated with human brain abscesses. *J Clin Microbiol.* 2002.

Schmidt, M., S. Unterer, J. S. Suchodolski, J. B. Honneffer, B. C. Guard, J. A. Lidbury, J. M. Steiner, J. Fritz, and P. Koller. 2018. The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PLoS ONE.* 13:e0201279. doi: 10.1371/journal.pone.0201279.

Silva, J. R. D. P. Netto, V. M. Scussel. Grãos secos da destilaria com solúveis, aplicação em alimentos e segurança: Revisão. *Pubvet*, v.10, nº3, p. 257-270. Mar., 2016.

XU, Z., et al. N-acetyl-L-leucine protects MPTP-treated Parkinson's disease mouse models by suppressing *Desulfohalobacterota* via the gut-brain axis. *Brain Research Bulletin*, v. 202, p. 110729, 2023.

YANG, J. et al. In vitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe*, v. 23, p. 74-81, 2013.

Yoon, S. J., Yu, J. S., Min, B. H., Gupta, H., Won, S. M., Park, H. J., Han, S. H., Kim, B-Y., Kim, K. H., Kim, B. K., Joung, H. C., Park, T-S., Ham, Y. L., Lee, D. Y., and Suk, K. T. 2023. *Bifidobacterium*-derived short-chain fatty acids and indole compounds attenuate nonalcoholic fatty liver disease by modulating gut-liver axis. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1129904. doi.org/10.3389/fmicb.2023.1129904.

ZHANG, X. et al. Effects of acarbose on the gut microbiota of prediabetic patients: a randomized, double-blind, controlled crossover trial. *Diabetes Therapy*, v. 8, p. 293-307, 2017.

ZHONG, Qi et al. Differential gut microbiota compositions related with the severity of major depressive disorder. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 907239, 2022.