



GUSTAVO AKIRA IGAKI

**ADIÇÃO DE ZEÓLITA, *YUCCA*, BETAGLUCANO E
BUTIRATO DE CÁLCIO EM DIETAS SECAS PARA CÃES:
EFEITOS SOBRE O MICROBIOMA**

**LAVRAS - MG
2023**

GUSTAVO AKIRA IGAKI

**ADIÇÃO DE ZEÓLITA, *YUCCA*, BETAGLUCANO E BUTIRATO DE
CÁLCIO EM DIETAS SECAS PARA CÃES: EFEITOS SOBRE O MICROBIOMA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Mestrado Profissional, área de concentração em Ciência e Tecnologia da Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Profª. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Orientadora
Profª. Dra. Luciana de Paula Naves
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2023**

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

Igaki, Gustavo Akira.

Adição de zeólita, *Yucca*, betaglucano e butirato de cálcio em dietas secas para cães: efeitos sobre o microbioma / Gustavo Akira Igaki. - 2023.

53 p.

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

Coorientador(a): Luciana de Paula Naves.

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

Bibliografia.

1. Saúde intestinal de cães. 2. Microbioma intestinal de cães. 3. Influência de aditivos de na saúde intestinal de cães. I. Saad, Flávia Maria de Oliveira. II. Luciana de Paula Naves.

Fonte: Universidade Federal de Lavras

GUSTAVO AKIRA IGAKI

**ADIÇÃO DE ZEÓLITA, YUCCA, BETAGLUCANO E BUTIRATO DE
CÁLCIO EM DIETAS SECAS PARA CÃES: EFEITOS SOBRE O MICROBIOMA**

**ADDITION OF ZEOLITE, YUCCA, BETAGLUCAN AND CALCIUM
BUTYRATE IN DRY DIETS FOR DOGS: EFFECTS ON THE MICROBIOME**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Mestrado Profissional, área de concentração em Ciência e Tecnologia da Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 28 de junho de 2023

Profa. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad - UFLA

Prof. Dr. Roberto Maciel de Oliveira - UFLA

Profa. Dra. Vanessa Avelar Silva - UFLA

Dr. Carlos Magno da Rocha Junior - Consultor Pet food autônomo

Profa. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

*À minha família, pessoas que sem as quais eu
nem sequer existiria e, ao mesmo tempo, que
me motivam, me inspiram, e me fazem seguir
em frente, crescendo, por eles.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Saad, pelos vastos conhecimentos compartilhados. À minha coorientadora, Profa. Dra. Luciana Naves, que me apresentou ao Programa de Mestrado Profissional da UFLA.

Agradeço à Profa. Dra. Maria de Godoy, pela possibilidade de uso dos laboratórios da Universidade de Illinois e pela disponibilidade dos dados analíticos.

Agradeço ao colega da UFLA, Lucas Santos, pela execução experimental e analítica, tanto em Lavras/MG como em Illinois/EUA. Ao colega, Mateus dos Santos, pela logística internacional das amostras.

Agradeço os cães do CENAC (Centro de Nutrição de Animais de Companhia) – UFLA, que participaram da fase experimental.

Agradeço a Vitaclassic, em nome dos proprietários Milena e Leandro Carvalho, por terem fabricado as rações formuladas para a execução do experimento.

Agradeço a Celta Brasil, especialmente ao CEO Fernando Borsatto, que me apoiou para embarcar neste projeto, bem como todos os colegas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

E, por fim, agradeço à Deus e à minha família por existirem na minha vida!

RESUMO

Aditivos como zeólita, extrato de *Yucca schidigera*, beta-glucanos e butirato de cálcio podem melhorar a saúde intestinal dos cães, reduzindo o odor fecal, estimulando o sistema imunológico e fornecendo energia para os enterócitos. Portanto, objetivou-se avaliar a ação sinérgica da zeólita clinoptilolita (ZC), *Yucca schidigera* (YSE), β -glucanos provenientes de algas e butirato de cálcio (BC) sobre o microbioma fecal de cães. O delineamento experimental utilizado foi o DBC, no qual, 15 cães, machos e fêmeas, com idade média de $6 \pm 0,14$ anos, foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, durante três períodos, totalizando nove repetições por tratamento. Os tratamentos foram: controle, sem nenhum aditivo (T0); T0 + 0,75% de ZC (T1); T0 + 0,75% ZC + 0,1% de YSE (T2); T0 + 0,75% de ZC + 0,1 YSE + 0,03% de β -Glucanos (T3); e T0 + 0,75% de ZC + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de BC (T4). Não houve diferenças significativas em relação, a alfa e beta diversidade de microrganismos encontrados nas fezes dos cães alimentados com diferentes tratamentos. Contudo, todos os tratamentos apresentaram uma α -diversidade alta, indicando um estado de eubiose, uma comunidade microbiana rica e equilibrada. Para todos os tratamentos foram encontrados a predominância dos seguintes filos, Firmicutes (51,34-62,36%), Bacteroidota (17,17-22,59%), Fusobacteria (13,29-20,35%), Actinobacteriota (2,21-4,89) e Proteobacteria (2,27-4,28%). Para todos os tratamentos, dentro do filo Firmicutes houve prevalência da bactérias do gênero *Allobaculum*. Estas estão relacionadas à produção de ácido butírico, AGCC que pode ser utilizado fonte de energia para os colonócitos. Com relação ao filo Bacteroidota, o gênero *Prevotella* apresentou alta abundância relativa, este contribui para a fermentação de polissacarídeos, portanto estão relacionadas ao aumento de AGCC no colón intestinal, sendo considerado um marcador de eubiose intestinal. Portanto, a inclusão de ZC, YSE, B-glucanos e BC proporcionou um ambiente intestinal em eubiótico, e pode por isto pode ser uma boa alternativa para o mercado *pet food*.

Palavras-chave: Eubiose. Aditivos. Saúde Intestinal.

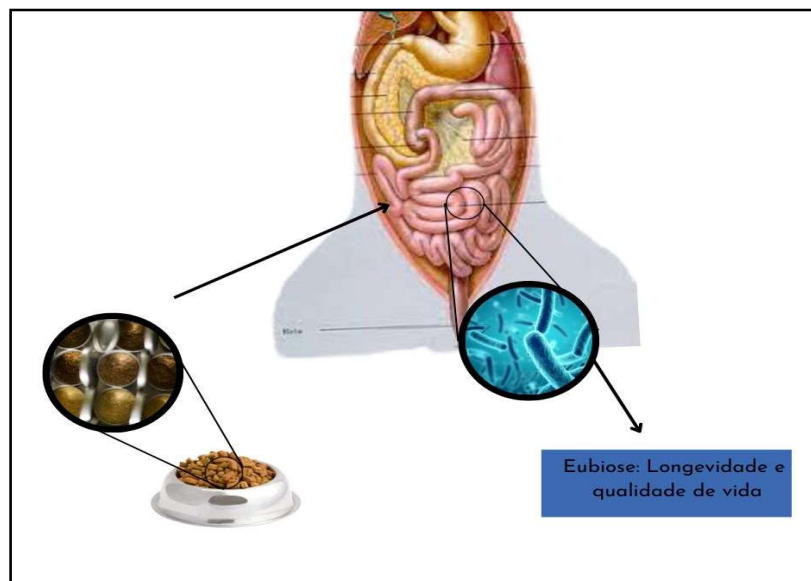
ABSTRACT

Additives such as zeolite, *Yucca schidigera* extract, beta-glucans and calcium butyrate can improve dogs' intestinal health by reducing fecal odor, stimulating the immune system and providing energy for enterocytes. Therefore, the objective was to evaluate the synergistic action of clinoptilolite zeolite (ZC), *Yucca schidigera* (YSE), β -glucans from algae and calcium butyrate (BC) on the fecal microbiome of dogs. The experimental design used was DBC, in which 15 dogs, males and females, with an average age of 6 ± 0.14 years, were randomly divided into five groups, during three periods, totaling nine replications per treatment. The treatments were: control, without any additives (T0); T0 + 0.75% ZC (T1); T0 + 0.75% ZC + 0.1% YSE (T2); T0 + 0.75% ZC + 0.1 YSE + 0.03% β -Glucans (T3); and T0 + 0.75% ZC + 0.1% YSE + 0.03% β -Glucans + 0.5% BC (T4). There were no significant differences in relation to the alpha and beta diversity of microorganisms found in the feces of dogs fed different treatments. However, all treatments showed high α -diversity, indicating a state of eubiosis, a rich and balanced microbial community. For all treatments, the following phyla predominated, Firmicutes (51.34-62.36%), Bacteroidota (17.17-22.59%), Fusobacteria (13.29-20.35%), Actinobacteriota (2.21-4.89) and Proteobacteria (2.27-4.28%). For all treatments, within the Firmicutes phylum there was a prevalence of bacteria of the genus *Allobaculum*. These are related to the production of butyric acid, SCFA, which can be used as an energy source for colonocytes. Regarding the phylum Bacteroidota, the genus *Prevotella* showed high relative abundance, which contributes to the fermentation of polysaccharides, therefore they are related to the increase in SCFA in the intestinal colon, being considered a marker of intestinal eubiosis. Therefore, the inclusion of ZC, YSE, B-glucans and BC provided a eubiotic intestinal environment, and could therefore be a good alternative for the pet food market.

Keywords: Eubiosis. Additives. Intestinal Health.

RESUMO INTERPRETATIVO

Certos ingredientes, como a zeólita, o extrato de *Yucca schidigera*, os beta-glucanos e o butirato de cálcio, quando colocados na ração, podem ajudar a melhorar a saúde intestinal dos cães, diminuindo o mau cheiro das fezes, fortalecendo o sistema imunológico e fornecendo energia para as células do intestino. Devido a este fato, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos combinados desses ingredientes no microbioma fecal dos cães. Para isso, 15 cães, machos e fêmeas, com idade média de 6 anos, foram divididos aleatoriamente em cinco grupos. Cada grupo recebeu uma dieta diferente durante três períodos. Não houve diferenças significativas na diversidade de microrganismos encontrados nas fezes dos cães alimentados com diferentes dietas. No entanto, todas as dietas resultaram em uma alta diversidade de microrganismos, indicando um estado de equilíbrio saudável da microbiota intestinal. O gênero *Allobaculum*, foi o mais prevalente dentro do filo Firmicutes. Essas bactérias estão relacionadas à produção de ácido butírico, um tipo de ácido graxo que pode ser usado como fonte de energia para as células do intestino. Dentro do grupo Bacteroidota, o gênero *Prevotella* apresentou alta abundância relativa. Essas bactérias contribuem para a fermentação de fibra, portanto estão relacionadas ao aumento de ácidos graxos no intestino, sendo considerado um marcador de equilíbrio saudável da microbiota intestinal. Portanto, a inclusão desses aditivos na dieta proporcionou um ambiente intestinal equilibrado e pode ser uma boa alternativa para a indústria de alimentos para pets.



Fluxograma demonstrando que quando o animal se alimenta de Zeólita Clinoptilolita e Yucca Schidigera ocorre eubiose intestinal.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.2	SAÚDE INTESTINAL DE CÃES	11
2.2.1	EUBIOSE E DISBIOSE INTESTINAL.....	12
2.2.2	16RRNA	14
2.2.3	PADRÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM CÃES	18
2.2	RELAÇÃO ENTRE DIETAS E MICROBIOTA EM CÃES.....	20
2.2.1	ZEÓLITAS	21
2.2.1.1	INFLUÊNCIA DA ZEÓLITA NO MICROBIOMA	22
2.2.2	<i>YUCCA SCHIDIGERA</i> (YSE)	23
2.2.2.1	INFLUÊNCIA DA YSE NO MICROBIOMA.....	24
2.2.3	B-GLUCANOS	24
2.2.3.1	INFLUÊNCIA DE B-GLUCANOS NO MICROBIOMA.....	25
2.2.4	BUTIRATO DE CÁLCIO (BC).....	26
2.2.4.1	INFLUÊNCIA DE BC NO MICROBIOMA	27
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	37
	ARTIGO – ADIÇÃO DE ZEÓLITA, YUCCA, BETAGLUCANO E BUTIRATO DE CÁLCIO EM DIETAS SECAS PARA CÃES: EFEITOS SOBRE O MICROBIOMA.	37
	INTRODUÇÃO	39
	MATERIAL E MÉTODOS	40
	ANIMAIS E DIETAS	40
	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DE AMOSTRAS	41
	MICROBIOTA FECAL: EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E BIOINFORMÁTICA.....	42
	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
	REFERÊNCIAS	51

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo e diversificado de microorganismos que habitam o trato gastrointestinal. Ela desempenha um papel crucial na saúde geral do indivíduo. A eubiose, um estado de equilíbrio saudável dessa microbiota, é essencial para a digestão eficaz dos nutrientes e para a regulação da resposta imune.

A dieta pode influenciar significativamente a microbiota intestinal dos cães, com a fibra dietética e a proteína desempenhando papéis importantes. A fibra dietética é fermentada pelas bactérias intestinais em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são benéficos para a saúde intestinal. Além disso, a fermentação da fibra pode promover o crescimento de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, melhorando assim a eubiose.

Aditivos alimentares como a zeólita clinoptilolita (ZC), o extrato de *Yucca schidigera* (YSE), os beta-glucanos e o butirato de cálcio (BC) podem ajudar a promover uma microbiota intestinal saudável em cães. A zeólita e o extrato de *Yucca schidigera* podem ajudar a reduzir o odor fecal, enquanto os beta-glucanos podem estimular o sistema imunológico e melhorar a saúde intestinal. O BC, por outro lado, fornece energia para os enterócitos e pode melhorar o desenvolvimento das vilosidades intestinais.

Exceto o butirato de cálcio, os demais ingredientes descritos têm seu uso consolidado na indústria de rações para cães e gatos. Porém, é necessário conhecer a ação destes quanto ao microbioma intestinal. Por isso, objetivou-se no presente estudo avaliar os efeitos sinérgicos da adição de zeólita clinoptilolita (ZC), *Yucca schidigera* (YSE), β -glucanos e butirato de cálcio (BC) sobre o microbioma de cães.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.2 Saúde Intestinal de Cães

Os microrganismos podem ser classificados como bactérias, vírus e fungos (AL-RASHIDI, 2022). São os seres mais abundantes e diversos do planeta terra, e por esse motivo, cães, gatos, assim como todos os seres multicelulares, estão em contato constante com a microbiota do ambiente. De acordo com Rinke et al. (2013), os microrganismos estão presentes em todos os nichos metabólicos. Por exemplo, ao nascimento ocorre a colonização do organismo por microrganismos que irão influenciar no desenvolvimento anatômico, fisiológico e imunológico do indivíduo (IEBBA et al., 2016).

O intestino é o órgão do corpo com maior presença de microrganismos, e o compartimento intestinal que apresenta maior quantidade microbiana é o colón (SARTOR, 2008; IEBBA et al., 2016). A presença da microbiota intestinal exerce grande influência em parâmetros de saúde do indivíduo. Uma vez que, as células epiteliais do intestino são responsáveis por direcionar os sinais emitidos dos microrganismos até as células imunológicas e vice-versa. A interação entre os microrganismos, e seus metabólitos com as células imunes, gera mediadores como as citocinas e quimiocina. Estas moléculas são responsáveis por modular a inflamação, participando tanto da inflamação aguda, quanto crônica através de uma complexa rede de interações (TURNER et al., 2014).

Além do aspecto imunológico uma microbiota intestinal está intimamente associada com a resposta nutricional e ciclo circadiano (LYNCH; HSIAO, 2019). No tópico nutricional a microbiota influencia no processo de fermentação intestinal. A fermentação de fibras no intestino grosso gera a formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (SUNVOLD et al., 1995), como o acetato, propionato e butirato. Os AGCC são conhecidos por proporcionar uma variedade de benefícios para a saúde intestinal. A literatura indica que uma dieta probiótica, que inclui uma maior quantidade de fibras fermentáveis, pode aumentar a produção de AGCC. Isso, por sua vez, reduz o pH do cólon, o que favorece a proliferação de bactérias eubióticas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, em detrimento de bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (CUMMINGS et al, 2004; MYINT et al, 2017; SUCHODOLSK et al, 2012; ALSHAWAQFEH et al, 2017; PALMQVIST et al, 2022).

A diminuição do pH no intestino tem dois efeitos principais: altera a composição da microbiota intestinal e impede o crescimento excessivo de bactérias patogênicas sensíveis ao pH, como *Enterobacteriaceae* e *Clostridia* (PROHÁSZKA et al, 1990; CHERRINGTON et al

1991; DUNCAN et al 2009; DEN BESTEN et al., 2013). Em contrapartida, a adição de proteínas na dieta aumenta o pH intestinal pois os microrganismos que degradam proteína produzem maior concentração de AGCR (EPHRAIM; COCHRANE; JEWELL, 2020), amônia (SMITH et al., 1997; KROUPINA; BÉMEUR; ROSE, 2022), fenóis e indóis (ANDREESSEN; BAHL; GOTTSCHALK, 1989), em relação aos AGCC. E a maior presença desses produtos no lúmen intestinal está associado a proteólise e a putrefação produzidas pelos microrganismos intestinais.

Percebe-se, que definir o conceito de saúde intestinal é extremamente difícil e complexo pois envolve, no mínimo, três temas diferentes, sendo estes a mucosa intestinal, dieta consumida e a microbiota intestinal (CONWAY, 1994). Portanto, nesta seção do referencial teórico iremos discutir conceitos relacionados a eubiose e disbiose canina.

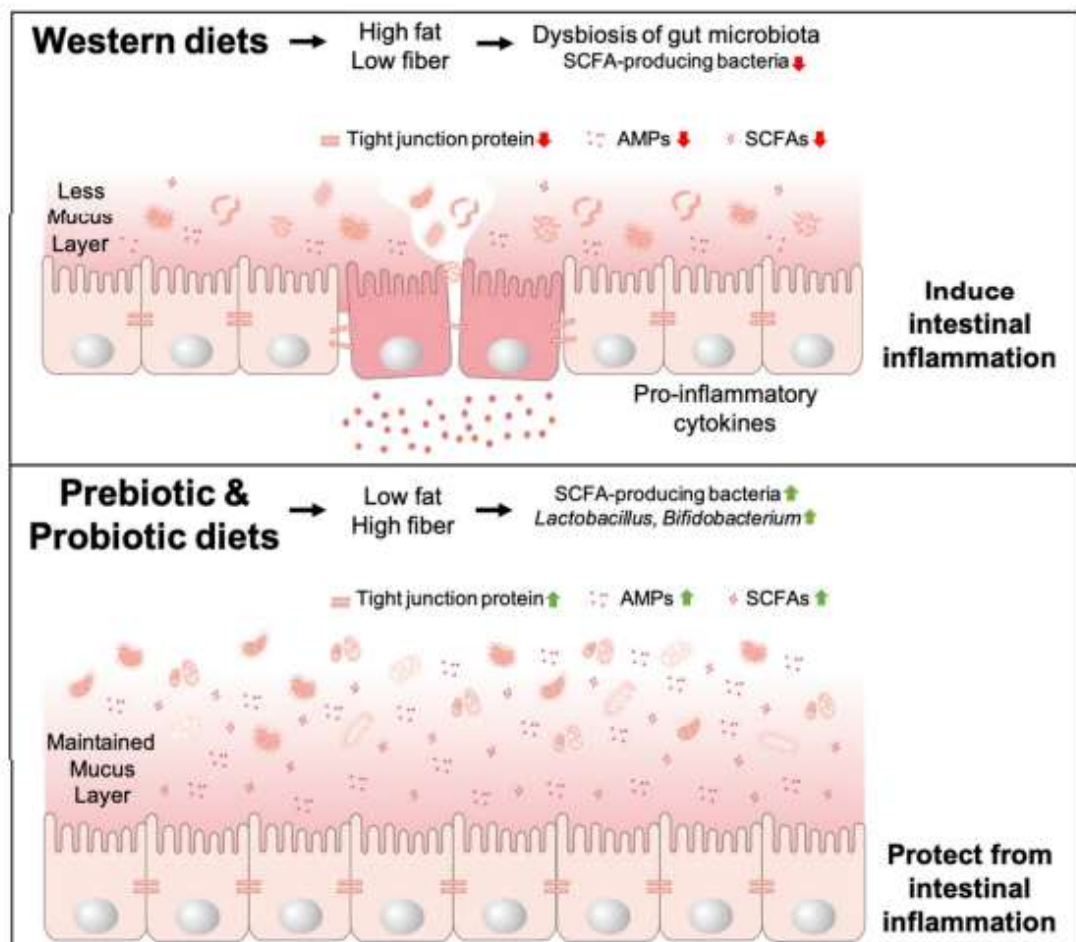
2.2.1 Eubiose e Disbiose intestinal

A composição de bactérias presente no lúmen intestinal de um indivíduo são dependentes de diversos fatores, como a própria genética do hospedeiro, ambiente que este está inserido e a dieta que consome (IEBBA et al., 2016). Após estabelecida, a microbiota presente no intestino pode ser denominada de comensal, e como já dito anteriormente, exerce funções de fermentação de alimentos, produção de vitaminas, auxilia no desenvolvimento dos tecidos intestinais, na resposta imune do hospedeiro e protege o ambiente intestinal de uma colonização de organismos patogênicos (RENZ; BRANDTZAEG; HORNEF, 2012; AL-RASHIDI, 2022). Desta forma, esta interação multifacetada, simbiótica, entre os microrganismos e o hospedeiro leva ao estado de eubiose. Iebba et al. (2016), traduz o conceito de eubiose como “O equilíbrio do ecossistema microbiano intestinal”.

Em uma situação de homeostase, ou eubiose intestinal, ocorre maior proporção de bactérias com potencial benéfico, como as dos filos bacterianos Firmicutes e Bacteroides. Em detrimento de bactérias com potencialmente patogênicas, como as do filo Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*) (IEBBA et al., 2016). Justamente pela proporção bacteriana descrita anteriormente, em um ambiente eubiótico ocorre maior produção de AGCC, a manutenção de junções firmes, a maior produção de muco e peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Figura 1) (LOBIONDA et al., 2019). Além disso, no ambiente eubiótico há maior expressão de proteínas de junções firmes (JF).

As junções firmes são compostas por dois tipos de proteínas, as proteínas transmembrana integrais, que tem a função de ligar fortemente uma célula epitelial a outra, e as proteínas de membrana periférica (LEE, et al., 2018). Portanto, são atribuídas as JF funções como a permeabilidade paracelular das células epiteliais, permitindo a passagem de água e minerais. O muco é considerado a segunda forma de defesa e está adjacente as células do epitélio. Segundo Perez-Lopez et al. (2016), o muco é composto por mucina e proteínas antimicrobianas, se espalha por todo epitélio intestinal, e impede que os microrganismos se aproximem das células epiteliais. A terceira forma de defesa do intestino se constitui através da ação das células imunológicas, sendo elas as placas de Peyer e nódulos linfáticos mesentéricos, ou espalhadas por todo o epitélio intestinal e lâmina própria. A formação do complexo células epiteliais, muco e células imunes constitui a barreira da mucosa intestinal (OKUMURA; TAKEDA, 2017) e impede que os microrganismos entrem em locais sistêmicos.

Figura 1- Ambiente intestinal em situação de Eubiose x Disbiose



Fonte: LOBIONDA et al., 2019

Em um cenário oposto, ou seja, em uma situação de disbiose ocorre o distúrbio da interação entre microrganismo e hospedeiro. De acordo com Lobionda et al. (2019), ocorre o

processo inverso dos descritos nos parágrafos anteriores, portanto há um aumento de bactérias com potencial patogênico, o que gera uma redução de AGCC, um afrouxamento das junções firmes, diminuição concomitante da produção de AMPs e muco pelo hospedeiro. Tais processos, fazem com que ocorra a passagem de bactérias para a lâmina própria, ocasionando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 1).

2.2.2 16rRNA

Como já descrito anteriormente, o intestino de mamíferos é um ecossistema rico em microrganismos e exerce diversas funções importantes para a sobrevivência de um indivíduo. Portanto, conhecer o perfil da comunidade microbioma desse ecossistema tem sido um importante desafio para cientistas microbiologistas. Apesar dos esforços para conhecer os microrganismos presentes nos TGI, o conhecimento é limitado pelo fato de grande parte das bactérias não ser cultivável em condições laboratoriais (YANG; WANG; QIAN, 2016). Quando se pensa em bactérias vivendo dentro do TGI, quando mais caudal, tendo como ponto de referência o animal, ou seja, quanto mais próximo ao intestino grosso, menor a concentração de oxigênio e maior a proporção de bactérias anaeróbias não cultiváveis (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020).

Tecnicamente a microbiota intestinal apresenta vários organismos, além de bactérias, que a contemplam. De acordo com Sarangi, Goel e Aggarwal (2019), encontra-se no intestino representantes de vírus, fungos e outros procariontes. Contudo, na literatura encontra-se predominantemente dados sobre as bactérias. Portanto nesta dissertação, trataremos como microbiota intestinal somente as bactérias presentes no intestino. A partir dessa definição, encontra-se uma gama de métodos que buscam compreender a diversidade microbiana presente no TGI, alguns deles serão exemplificados na tabela abaixo.

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 <ol style="list-style-type: none"> 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;

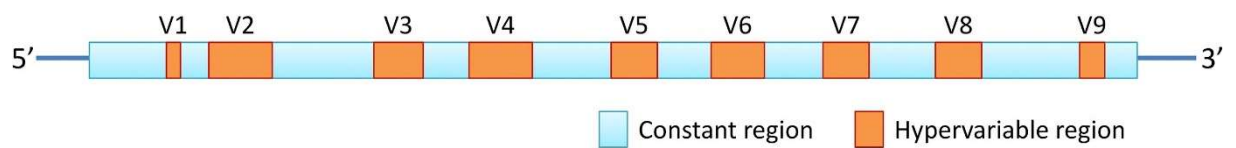
Fonte: Modificado de SARANGI; GOEL; AGGARWAL (2019)

A composição da microbiota intestinal é complexa e diversificada, com uma variedade de organismos que exibem diferentes graus de adaptabilidade ao crescimento em condições de cultura. Portanto, a representação de várias bactérias no lúmen intestinal, inferida por meio de técnicas baseadas em cultura, é fortemente enviesada em favor de organismos aeróbios que se adaptam facilmente ao crescimento in vitro. Isso resulta em uma sub-representação significativa das bactérias anaeróbias presentes. Além disso, essas técnicas tendem a subestimar drasticamente a diversidade bacteriana no conteúdo luminal intestinal. Conseqüentemente, sua aplicabilidade na investigação de mudanças no perfil da microbiota intestinal é restrita (SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019).

O avanço tecnológico atual contribuiu para que o conjunto de pesquisadores conseguisse sobrepor as limitações presentes no modelo baseado em cultura. Dessa forma, foram estabelecidas várias abordagens moleculares. Nestas abordagens, a identificação de diferentes espécies bacterianas é realizada com base nas sequências do RNA ribossômico 16S (16S rRNA)

(SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019). O gene 16S rRNA, que contém regiões altamente conservadas para a elaboração de primers e regiões hipervariáveis para a identificação de características filogenéticas de microrganismos, emergiu como o gene marcador mais utilizado para o perfilamento de comunidades bacterianas. As sequências completas do gene 16S rRNA são compostas por nove regiões hipervariáveis (V1 à V9) (Figura 2), intercaladas por nove regiões altamente conservadas (BAKER; SMITH; COWAN, 2003; TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; WANG; QIAN, 2009; YANG; WANG; QIAN, 2016).

Figura 2 - Uma representação do gene 16S do RNA ribossômico mostrando as nove regiões hipervariáveis (em marrom) e regiões constantes (em azul).

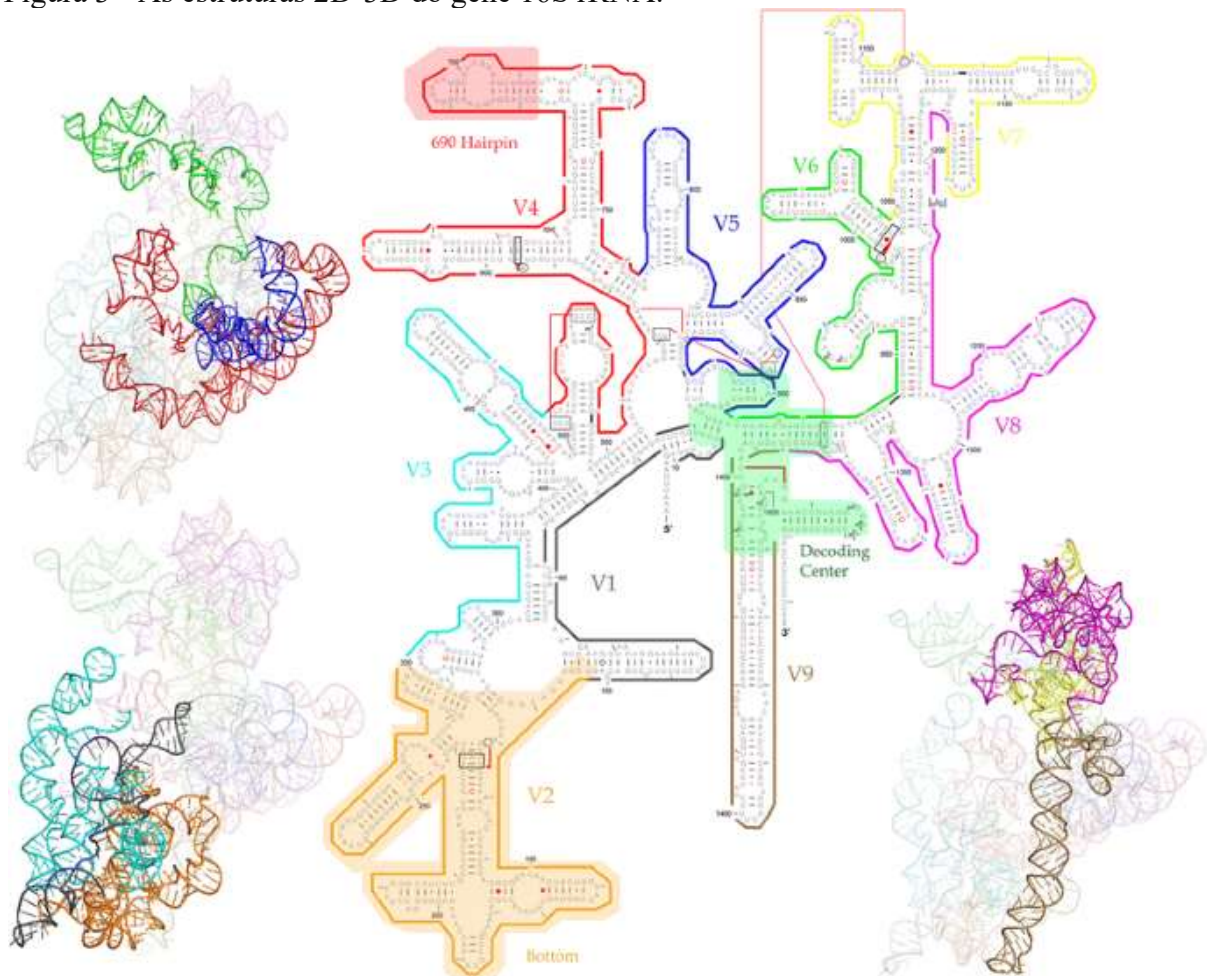


Fonte: SARANGI; GOEL; AGGARWAL, 2019

Acredita-se que o alto grau de conservação do rRNA 16S seja um reflexo de sua importância crítica para a função celular. Isso se contrasta com os genes que codificam enzimas, onde as mutações são geralmente mais toleradas, pois podem afetar estruturas que não são tão únicas e essenciais quanto o rRNA. Por exemplo, se uma bactéria não possui o gene necessário para produzir as enzimas que metabolizam a lactose, ela pode recorrer a uma fonte alternativa de energia, como outro açúcar ou proteína. Portanto, poucos genes exibem um grau de conservação tão elevado quanto o gene 16S rRNA, (CLARRIDGE III, 2004).

A tecnologia empregada no sequenciamento do gene 16S rRNA permite a leitura dos produtos de PCR que são amplificados utilizando primers universais apropriados, direcionados a uma ou mais regiões do 16S rRNA. Desta forma, para obtenção do perfil taxonômico do microbiota, agrupa-se as sequências de 16S rRNA em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Para que um gene seja considerado parte de uma OTU, ele deve apresentar, no mínimo, 97% de identidade no alinhamento do gene (ELLEGAARD; ENGEL, 2016).

Figura 3 - As estruturas 2D-3D do gene 16S rRNA.



Fonte: YANG; WANG; QIAN, 2016

As OTUs dos microrganismos são frequentemente expressas em termos de diversidade alfa e beta. Segundo Willis (2019), a α -diversidade é utilizada para relatar a diversidade microbiana de uma comunidade. A α -diversidade pode ser descritas em três índices. A riqueza da comunidade é uma medida utilizada para estimar o número total de espécies presentes em um determinado ambiente. Existem várias métricas que podem ser usadas para estimar a riqueza, incluindo o índice Chao1, o estimador de cobertura baseado em abundância (ACE) e o número de espécies observadas (representado pelo número de diferentes unidades taxonômicas operacionais, OTUs, por amostra). Essas métricas são amplamente utilizadas em estudos de biodiversidade para fornecer 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).

Outra forma de mensuração da α -diversidade é a “diversidade da comunidade”. Esta é uma medida que avalia a uniformidade relativa das espécies presentes em uma amostra, levando em consideração tanto a riqueza de espécies quanto a uniformidade de sua distribuição. Essa

medida é frequentemente quantificada por meio de índices como o índice de Shannon e o índice de Simpson. O índice de Shannon leva em conta a abundância e a diversidade das espécies presentes, enquanto o índice de Simpson enfatiza a dominância das espécies mais abundantes (FINOTELLO et al. 2018; HAGERTY et al., 2020; QIAN et al., 2020, LI et al., 2022). Além desses índices, a diversidade filogenética também é um indicador importante. A diversidade filogenética é calculada somando-se o comprimento dos ramos filogenéticos interconectados das espécies em uma árvore filogenética. Ela reflete a história evolutiva e as relações entre as espécies presentes em uma comunidade (GUMBS et al., 2020; LI et al., 2022).

A α -diversidade é um indicador amplamente utilizado para avaliar a saúde da microbiota intestinal e está diretamente relacionada ao estado de doença. A biodiversidade desempenha um papel fundamental na manutenção de um ecossistema equilibrado, contribuindo para a estabilidade e a função ecológica do mesmo. Em geral, um alto nível de diversidade proporciona uma maior estabilidade ao ecossistema, garantindo seu funcionamento adequado (GONG et al., 2016; LI et al., 2022).

A β -diversidade avalia as diferenças/similaridades em relação às comunidades microbianas relacionadas a diferentes amostras. Existem diferentes índices comumente usados para calcular a diversidade beta, incluindo o índice de Bray-Curtis, o índice Unifrac, o índice de Jaccard e a distância de Aitchison. Cada um desses índices enfatiza diferentes aspectos da diversidade. Por exemplo, o índice Unifrac leva em consideração informações filogenéticas (SU, 2023).

2.2.3 Padrão da microbiota intestinal em cães

O padrão de colonização microbiano do intestino dos cães e gatos não difere significativamente do padrão encontrado com outros mamíferos, portanto o TGI é considerado estéril ao nascimento, porém rapidamente é colonizado por bactérias. Segundo FAHEY et al. (2008), a idade, estado de saúde, dieta e ambiente influenciam ativamente no processo de colonização e na composição da população microbiana em cães. De acordo com PILLA; SUCHODOLSKI (2020), em cães a quantidade e a riqueza de bactérias aumentam ao decorrer do TGI, ou seja, no intestino grosso a presença de microrganismos é maior em comparação com intestino delgado. Os mesmos autores ainda relatam, que devido ao advento de recentes métodos de análise, estão sendo identificados bactérias não cultiváveis no TGI de cães, assim

a quantidade de bactérias que colonizam o intestino dos animais aumentou, sendo considerada atualmente 10 vezes maior do que o número de células no animal.

Cada compartimento intestinal possui uma função e um microambiente, por isso a população microrganismos varia de acordo com o local que está presente no TGI. No intestino delgado, por exemplo, encontra-se bactérias aeróbios e facultativas, em contrapartida, no intestino grosso, principalmente no colón, encontra-se quase exclusivamente bactérias anaeróbias (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020). Handl et al. (2011) coletaram fezes de 12 gatos e 12 cães saudáveis e que não receberam medicamentos e vacinados. Ao analisar a população bacteriana das fezes dos animais, os autores constataram que ambas as espécies possuíram o filo Firmicutes em maior quantidade. As espécies mais encontradas deste filo foram *Clostridium spp.* e *Lactobacillus spp.*, sendo que proporção em cães foi de 95,3% e em gatos de 92,1%. Quando os autores compararam a proporção das classes dentro do filo Firmicutes, percebeu-se que os grupos de *Clostridium* e *Ruminococcus* se destacaram. A predominância do segundo filo variou entre as espécies, em cães constatou-se 2,3% de Bacteriodetes e em gatos destacou-se as Actinobacterias na proporção de 7,3% da contagem populacional total.

Através da técnica 16S rRNA gene amplicon-based 454-pyrosequencing Middelbos et al. (2010), observaram o efeito da inclusão de 7,5% de fibra de polpa de beterraba no microbioma intestinal canino. Verificou-se que a inclusão da fibra reduziu a quantidade de representantes do filo Fusobactéria e aumentou a população de Firmicutes, quando comparado ao controle. Hooda et al. (2012) utilizou a mesma técnica dos autores supracitados para avaliar os efeitos da relação proteína:carboidrato sobre o microbioma de gatos filhotes. Os resultados demonstraram maior população de Actinobacteria e menor de Fusobacteria quando os animais consumiram uma dieta com alta relação proteína:carboidrato. Esses resultados corroboram com Barry et al. (2010) que utilizaram a inclusão de 4% de fruto-oligosacarídeos (FOS), 4% de pectina e 4% de celulose para gatos saudáveis. Foi constatado maior população de Actinobacterias nos animais que consumiram FOS, e maior população de Firmicutes nos animais que consumiram pectina.

Em um outro trabalho utilizando a técnica 16S rRNA gene amplicon-based 454-pyrosequencing, foram utilizados seis cães adultos da raça Beagle, para testar a influência de dois níveis (7,5 e 15%) de três farinhas de insetos (barata de madagascar, barata cinéria e tenébrio gigante), no microbioma dos animais. Os resultados demonstraram que os filios predominantes, presentes em todos os cães, foram Firmicutes (29,9- 44,1%), Bacteriodetes (19,1- 24,3%), Proteobacteria (2,5 – 5,5%) e Fusobacteria (13,4 – 44,5%). O mesmo ensaio foi

repetido para gatos e foi constatado que os filos predominantes encontrados, presentes em todos os gatos, foram Firmicutes (57-67%), Bacteroidetes (11-29%), Actinobacteria (22-9%), Proteobacteria (5-1%) e Fusobacteria (0-1%).

Esses resultados corroboram com Sabbioni et al. (2020), que informa que os filos bacterianos predominantes no cólon e nas fezes de cães são representados por Firmicutes (40–60%), Bacteroidetes (5–10%), Proteobacteria (15–20%) e Fusobacteria (5%). Diferentemente dos humanos, as amostras de fezes dos cães representam de maneira fidedigna a maioria dos táxons bacterianos relevantes. Pesquisadores acreditam que a veracidade desta informação está relacionada a anatomia mais curta quando comparada a humanos e com a rápida taxa de passagem da digesta (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020). Na literatura, existem variações sobre os principais filos encontrados em cães, isto pode acontecer devido aos métodos de análise do microbioma, mas também pode existir variações individuais. Contudo é importante ressaltar que os três principais filos encontrados no microbioma fecal de cães saudáveis são Fusobacterium, Bacteroidetes e Firmicutes (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020).

Pilla e Suchodolski, (2020), relatam que dentro do filo Firmicutes, a classe Clostridia é a mais abundante, sendo encontrados três grupos principais de Clostridium, o grupo IV que contempla a família *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*, o grupo XI que contempla a *Peptostreptococcaceae* e o grupo XIV onde são encontradas as famílias *Lachnospiraceae*, *Blautia spp.* Os Bacilli, o segundo maior grupo dentro dos Firmicutes, são constituídos apenas de Lactobacillales, assim, os gêneros mais encontrados são *Streptococcus* e *Lactobacillus*. A classe Erysipelotrichi representa o terceiro maior grupo no filo Firmicutes, sendo os principais constituintes os gêneros *Turicibacter*, *Catenibacterium* e *Coprobacillus*.

2.2 Relação entre dietas e microbiota em cães

Pesquisas com várias espécies indicam que a dieta pode alterar o microbioma intestinal. Embora os cães sejam predominantemente carnívoros, a convivência simbiótica com os humanos levou a uma dieta rica em carboidratos para esses animais. Atualmente, 95% do mercado de alimentos para cães é composto por dietas secas, que requerem uma grande quantidade de carboidratos para serem bem extrusadas (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020). Para os cães, a origem dos ingredientes é menos importante do que a composição geral dos macronutrientes. Estudos mostram que dietas extrusadas com a mesma quantidade de proteínas, sejam elas de origem vegetal ou mista (vegetal e animal), não alteram a composição do

microbioma dos cães (BRESCIANI et al., 2018). A seguir, serão discutidos os impactos dos aditivos estudados na saúde intestinal dos cães.

2.2.1 Zeólitas

A palavra zeólita tem origem grega e pode ser traduzida como “pedra borbulhante” (“zeolithos”, onde “zeo” significa ferver e “lithos” significa pedra) (COOMBS et al., 1997). As zeólitas podem ser encontradas na natureza, geralmente onde rochas ou cinzas vulcânicas entram em contato com água alcalina. Elas também são encontradas em bacias oceânicas, onde ocorre a cristalização de sedimentos ao longo de milhares de anos (MARÇAL et al., 2006).

Sabe-se que existem cerca de 80 tipos naturais de zeólitas, e mais de 150 foram criadas em laboratório (SCHNEIDER; ZIMMERMANN; GEWEHR, 2017), sendo a zeólita mais comum na natureza é a clinoptilolita. Sua fórmula química é: $(\text{Na},\text{K},\text{Ca})_{2-3}\text{Al}_3(\text{Al},\text{Si})_2\text{Si}_{13}\text{O}_{36} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Desta forma, as zeólitas podem ser caracterizadas como aluminossilicatos hidratados de metais alcalinos e alcalinos terrosos que possuem estruturas cristalinas tridimensionais compostas por tetraedros interconectados (MING; MUMPTON, 1989). Esses tetraedros são constituídos por quatro moléculas de oxigênio em torno de um cátion, como $[\text{SiO}_4]^{5-}$ e $\{\text{AlO}_4\}^{5-}$ (COOMBS et al., 1997). Portanto, a estrutura microporosa resulta da ligação de cada átomo de oxigênio a dois tetraedros adjacentes, criando grandes espaços internos na molécula.

Devido as suas características físico-químicas, Luz (1995) destaca que as zeólitas possuem alto grau de hidratação; baixa densidade e grande volume de vazios quando desidratada; estabilidade da estrutura cristalina, mesmo ao ser desidratada; capacidade de troca catiônica (CTC); condutividade elétrica; adsorção de gases e vapores e propriedades catalíticas. Por isso, as zeólitas têm aplicações variadas, incluindo a indústria petrolífera, agricultura, armazenamento de calor, controle de poluentes, purificação de águas e mananciais e construção civil (ELLIOT E ZHANG 2005; OBER, 2016; NAHLI et al., 2017).

Além das propriedades de trocas catiônica, adsorção/dessorção, as zeólitas possuem grande seletividade e capacidade de adsorção pela amônia (NH_4^+). Essa afinidade ocorre devido trações eletrostáticas entre NH_4^+ carregados positivamente e sítios carregados negativamente da estrutura das zeólitas (AIYUK ET AL. 2004; ENGLERT; RUBIO 2005; NAHLI et al., 2017). Isso torna as zeólitas uma tecnologia promissora para uso na agricultura,

pois a ligação entre a zeólita e a amônia aumenta a capacidade do solo em reter nutrientes como fósforo e potássio (NAHLI et al., 2017).

2.2.1.1 Influência da zeólita no microbioma

Estudos demonstram que a zeólita pode estar associada a redução de microrganismos patogênico no TGI dos animais. Frangos receberam suplementação com zeólita clinoptilolita natural e sintética apresentaram maior altura de vilosidade na mucosa ileal e jejunal. Neste ensaio, foi constatado redução da contagem total de cepas de *Escherichia coli* com as duas fontes de zeólita utilizadas (WU et al., 2013). Também foi detectado redução de *E. coli*, quando suínos foram alimentados com zeólita (WANG et al., 2021). Os autores suplementaram 180 suínos em terminação com doses de 0,05 e 0,1% de zeólita clinoptilolita. Os tratamentos com clinoptilolita reduziram a *Escherichia. coli* ($P < 0,05$) contagens em comparação com o tratamento controle.

Em uma publicação recente, foi realizado a composição do microbioma de cães alimentados com zeólita (SABBIONI et al., 2020). Os autores submeteram 20 cães da raça Setter Inglês a dose de 5 g/kg de ração de zeólita chabazítica durante 28 dias. Vale ressaltar que estes animais recebiam dieta de carne crua de aves, e foram submetidos diariamente a atividade física. O perfil microbiano foi realizado pelo método gene amplicon-based 454-pyrosequencing. Os resultados demonstraram que o filo Firmicutes (média 51,15% ± 11,46%) representou o filo dominante da comunidade cecal em cães, superando as Proteobactérias (média 27,06% ± 15,75 %), os filios Fusobacteria (média 8,54% ± 3,46%) e os Bacteroidetes (média 5,49% ± 2,62%). Quando se levou em consideração a família bacteriana, percebeu-se que no grupo tratado com zeólita houve redução nos membros da família Enterobacteriaceae (-66,99%), como *Escherichia*, *Klebsiella*, e *Hafnia* e aumento nos *Lactobacillus* (205,16%) e *Bifidobacterium* (75,35%).

É discutido no trabalho que o aumento na abundância relativa de *Lactobacillus ssp.* bem como *Bifidobacterium ssp.*, acompanhados por uma diminuição nos filotipos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* quando os cães foram alimentados com zeólita pode estar relacionada a capacidade adsorptiva da zeólita. Encontra-se na literatura trabalhos que associam a zeólita com a redução de *E.coli* membro da família *Enterobacteriaceae* (WU et al., 2013; WANG et al., 2021). Além disso, as cepas *E. coli* e Enterobacterias podem causar de infecções

oportunistas em cães (OGEER-GYLES et al., 2006), enquanto *C. perfringens* está fortemente relacionada à gastroenterite hemorrágica (SCHLEGEL et al., 2012).

2.2.2 *Yucca schidigera* (YSE)

A *Yucca schidigera* (YSE) é uma espécie de planta da família Agavaceae que cresce em desertos e encontra-se quase que exclusivamente no sudoeste dos Estados Unidos da América e no México (LI et al., 2021). A YSE contém em sua estrutura, compostos chamados de saponinas que são glicosídeos amplamente encontradas no reino vegetal com relatos de ocorrência deles em 100 diferentes famílias. As saponinas, composto ativo responsável pela funcionalidade do extrato na nutrição animal, têm várias funções nas plantas, incluindo a regulação do crescimento e defesa contra insetos e alguns patógenos (CHEEKE, 2000).

A palavra saponina tem origem no termo latino “sapo”, que significa sabão, devido à capacidade dessas moléculas de formar espuma quando agitadas em água. As saponinas possuem estruturas que incluem açúcares, geralmente glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose, ramnose ou metilpentose, ligados a uma aglicona hidrofóbica (sapogenina) que pode ser triterpenóide ou esteróide (DAS et al., 2012). Quimicamente, as saponinas triterpenóides e esteróides são compostas por 30 átomos de carbono contendo precursor oxidosqualeno (HARALAMPIDIS et al., 2002; VINCKEN et al., 2007) e têm alto peso molecular, com 1 a 8 resíduos de açúcares ligados ao triterpeno ou fração aglicona esteroidal (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; VINCKEN et al., 2007). A cadeia de açúcares nas moléculas de saponinas pode variar e geralmente são anexadas ao C3 ou C17 (via C28) (VINCKEN et al., 2007).

Além da fração de saponina, a YSE também contém glicocomponentes. Khaskheli et al. (2020) relatam que o extrato de YSE possui dois componentes ativos: o glicol, que pode se ligar à amônia, e as saponinas, cujas propriedades já foram descritas. A porção glicol da YSE, também chamada de porção solúvel, é altamente termoestável e tem a capacidade de capturar moléculas de amônia e convertê-las em nitrato e nitrito (HEADON; DAWSON, 1990; ABDEL-TAWWAB et al., 2020; DAWOOD et al., 2020). Segundo Sutton et al. (1992) os glicocomponentes são estruturas moleculares altamente termoestáveis que têm a propriedade de sequestrar amoníaco do trato digestivo, proveniente dos processos metabólicos, neutralizando seus efeitos prejudiciais e convertendo-o em outro tipo de composto nitrogenado não tóxico. Assim melhorando as condições para que a flora intestinal aumente sua atividade degradativa, resultando em uma digestão mais completa.

2.2.2.1 Influência da YSE no microbioma

A adição de extrato de YSE na dieta de leitões acarretou no crescimento de *Bifidobactérias*, *Eubactérias* e *Estafilococos*, em comparação com os porcos que receberam dieta não suplementada (KATSUNUMA et al., 2000). Em um trabalho mais recente, foi constatado que a suplementação dietética de YSE aumentou a altura das vilosidades ileais, altura das vilosidades / profundidade da cripta ($P < 0,05$) e diminuiu a profundidade das criptas ($P < 0,05$) (YANG et al., 2021). A suplementação dietética de YSE não teve efeito significativo na abundância relativa nos filos Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria Verrucomicrobia, Tenericutes e Lentisphaerae.

Em um estudo *in vitro* foi analisado o efeito do extrato de YSE nos metabólitos da fermentação de proteínas (ácidos graxos de cadeia curta [SCFA] e ácidos graxos de cadeia ramificada, compostos fenólicos e indólicos, amins biogênicas, amônia e pH) usando inóculos fecais de cães alimentados com uma dieta de baixa (B) ou alta (A) proteína (proteína bruta 201 ou 377 g / kg como alimentação) (VIERBAUM et al., 2018). Foi constatado que independente da quantidade da proteína a YSE reduziu a quantidade de amônia e SCFA total. Notou-se que o microbiota dos cães variou de acordo com a mudança do nível proteico da dieta, indicando que o extrato de YSE não modificou o microbioma dos animais. Animais que foram alimentados com dieta pobre em proteínas apresentaram menor quantidade de *Eubacterium spp.* e maior *Hespellia spp.*, enquanto cães alimentados com dieta rica em proteínas apresentaram menor abundância de *Clostridium spp.* e *Robinsoniella spp.*

2.2.3 β -Glucanos

Os β -glucanos são polissacarídeos compostos por mais de 250.000 unidades de D-glicose unidas por uma ligação β -glicosídica. A estrutura dos β -glucanos pode variar dependendo da fonte. Por exemplo, os β -glucanos de cogumelos possuem ramificações β (1, 6) curtas ligadas a uma estrutura β (1, 3). Já os β -glucanos de aveia e cevada são ligações β (1,4) lineares que separam cadeias mais curtas de estruturas β (1,3) (JAYACHANDRAN et al. 2018). Pesquisas indicam que a forma da molécula dos β -glucanos, incluindo o tipo de ligação, a presença e o grau de ramificações, o peso molecular e a solubilidade, podem influenciar a natureza e a intensidade dos efeitos deste aditivo no trato gastrointestinal (FERREIRA et al. 2018).

A atuação desses compostos sobre processos metabólicos e fisiológicos no organismo, principalmente aqueles extraídos de cereais, os quais são caracterizados como fibras solúveis, vêm sendo bastante estudada, demonstrando-se efeitos positivos sobre as concentrações sanguíneas de glicose, colesterol e frações lipoprotéicas. Além disso, alguns estudos demonstram a capacidade dos beta-glucanos em estimular a saciedade, assim como reduzir a digestibilidade de nutrientes, interferindo na ação de enzimas digestivas sobre os nutrientes, reduzindo os valores de digestibilidade (GRAHAM; AMAN, 1991; ALMIRALL et al., 1995).

2.2.3.1 Influência de β -Glucanos no microbioma

Os cereais β -glucanos tem características interessantes a saúde animal, pois têm propriedades profiláticas e terapêuticas promissoras, como anticâncer, antidiabético, imunomodulador, antiinflamatório e protetores da pele (CLEMENTE et al., 2012; SHEN et al., 2016; JAYACHANDRAN et al., 2018; SHOUKAT; SORRENTINO, 2021). Esse PNA é completamente fermentados no intestino grosso o que proporciona aumento da microbiota intestinal benéfica devido suas propriedades probióticas (LAM et al., 2018). Desta forma, os β -glucanos estão envolvidos na minimização dos níveis de oxigênio luminal, aumentam a absorção de água e íons, fortalecem as proteínas de junção apertada e proporcionam melhor relação vilos/cripta, aumentam a imunidade inata e adaptativa, geram maior a disponibilidade de energia para as células da mucosa e aumentam o espessamento do muco (ADEBOWALE et al., 2019). β -glucanos também acarretam na diminuição do pH intestinal, e este parâmetro exerce uma grande sob parâmetros de absorção e no microbioma intestinal (HAJATI; REZAEI, 2010).

Em um estudo *in vivo*, quarenta e dois voluntários de 39 a 70 anos foram submetidos ao consumo de um bolo contendo 0,75 gramas de β -glucanos por 30 dias. Ao analisar as amostras de fezes, foi constatado aumento significativo na contagem de *Bifidobacteria spp* no dia 30. As concentrações de *Lactobacilli spp* também aumentaram no dia 30 em relação ao dia 15. No dia 45, as fezes dos voluntários foram submetidas a novas análises, um aumento foi observado nas contagens de coliformes totais e *E. coli* em 45 dias em comparação com 15 e 30 dias de ingestão do bolo (MITSOU et al., 2010). Os autores relatam que a população de *Enterobacteriaceae* ou *E. coli* não tem capacidade para fermentar os β -glucanos. Esses resultados corroboram com outros pesquisadores que testaram a fermentação de β -glucanos *in vitro* e em animais (KONTULA et al., 1998; JASKARI et al., 1998; CRITTENDEN et al., 2002; DONGOWSKI

et al., 2002; DRZIKOVA et al., 2005). Na tabela encontra-se os principais resultados encontrados na literatura sobre o efeito dos β -glucanos na microbiota intestinal.

Tabela 1 - Efeito de β -glucanos no microbioma intestinal.

Autores	Efeito dos β -glucanos
Mitsou et al. (2010)	Aumento significativo de <i>Bifidobacteria spp</i>
De Angelis et al. (2015)	↑ <i>Roseburia hominis</i> , <i>Ruminococcus ssp</i> , <i>Clostridiaceae spp.</i> ↓ <i>Fusobacteria e Firmicutes</i>
Velikonja et al. (2019)	↑ <i>Bifidobacterium spp.</i> e <i>Akkermansia muciphila</i>
Wang et al. (2016)	↑ <i>Bacteroidetes</i> e ↓ <i>Firmicutes</i>
Mikkelsen et al. (2017)	↑ <i>Bifidobacterium</i> ↓ <i>Bacteroides/Prevotella</i> and <i>Lactobacillus</i>
Fehlbaum et al. (2018)	↑ <i>Prevotella</i> and <i>Roseburia</i>
Zhu et al. (2020)	↑ <i>Clostridium</i> , and <i>Butyricoccus</i> , ↓ <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Oscillospira</i> , and <i>Ruminococcus</i>

Fonte: Modificado de SHOUKAT; SORRENTINO (2021)

Em um experimento ratos, foram alimentados com dieta teste rica em fibras contendo 500 g/kg de produtos à base de aveia por seis semanas. Os autores relatam que produtos a base de aveia continham de 4 a 128 g/kg de amido resistente, de 30 a 92 g/kg de b-glucanos e 122 a 304 g/kg de fibra alimentar total. Em todos os tratamentos exceto o controle, foi observado aumento de *Bifidobacterium* (DRZIKOVA et al., 2005). Em um estudo realizado em humanos, foi avaliado 26 indivíduos saudáveis antes (HS) e após (HSB) 2 meses de consumo com uma dieta contendo 3 gramas de β -glucanos proveniente da cevada. As bactérias metabolicamente ativas foram analisadas por meio de pirosequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados demonstraram que os níveis de *Clostridiaceae* (*Clostridium orbiscindens* e *Clostridium sp.*), *Roseburia hominis* e *Ruminococcus sp.* aumentaram, e houve diminuição dos níveis de *Firmicutes* e *Fusobacteria* (DE ANGELIS et al., 2015).

2.2.4 Butirato de Cálcio (BC)

O ácido butírico é um tipo de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) que é produzido durante a fermentação de compostos vegetais no cólon (GUILLOTEAU et al. 2010). Este composto tem um impacto significativo na proliferação, crescimento e diferenciação das células da mucosa intestinal, pois pode influenciar a expressão genética e a síntese de proteínas (GÜMÜS et al. 2020). Desta forma, os colonócitos podem usar o butirato como fonte de energia. Isso acontece através da ativação da sinalização PPAR γ , que direciona o metabolismo

dos colonócitos de superfície para a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, um processo crucial para manter a hipóxia epitelial (LITVAK et al. 2018).

Na nutrição animal, as formas salinas do ácido butírico são preferidas devido ao forte odor deste aditivo (GÜMÜS et al., 2020). O butirato de cálcio é amplamente utilizado na alimentação animal como uma fonte de energia para os enterócitos, resultando em melhor desenvolvimento das vilosidades (EL-WAHAB et al. 2019). Além disso, o butirato de cálcio é conhecido por reduzir o pH da mucosa intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias comensais (AHSAN et al., 2016; EL-WAHAB et al. 2019). Quando o pH está acima de 5,0, as bactérias patogênicas se multiplicam facilmente. No entanto, quando o pH está entre 3,5 e 4,0, as bactérias benéficas se desenvolvem mais facilmente (GRECCO, 2013).

2.2.4.1 Influência de BC no microbioma

Em animais de produção, o butirato é amplamente utilizado, principalmente pelo fato de as cadeias produtivas tentarem minimizar o uso de antibióticos. Sobre o butirato nos sistemas de produção, são constatados efeitos positivos em parâmetros que mensuram a saúde intestinal. Nesse sentido, Ridder et al. (2013), avaliaram o efeito da vacinação e do butirato de cálcio contra a propagação de *Salmonella Typhimurium* por meio de um experimento de transmissão com 56 leitões. O experimento consistiu no tratamento de dois grupos de animais com uma vacina que continha com 107 - 108 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) / 2 mL de uma cepa atenuada de *S. Typhimurium*, posteriormente um grupo foi escolhido aleatoriamente para receber o butirato de cálcio. Duas semanas após a vacinação, quatro porcos por grupo foram desafiados oralmente com 107 UFC / 2 mL de uma cepa de *Salmonella Typhimurium*. Os resultados demonstraram que no grupo que recebeu a vacina e o butirato, houve menos excreção de *Salmonella* nas fezes, e menos amostras de tecido deram positivas para a bactéria. Estes resultados corroboram com GALFI; BOKORI (1990) observaram alterações na microbiota ileal com diminuição da proporção de bactérias coliformes e aumento simultâneo de lactobacilos ao utilizarem butirato para suínos.

EL-WAHAB et al. (2019) avaliaram o efeito do butirato de cálcio na alimentação de codornas japonesas. Os autores avaliaram 320 codornas submetidas a 4 tratamentos, sendo, o controle, e suplementação com butirato de cálcio a 0,3, 0,5 e 0,7 g/Kg de dieta. Em todos os tratamentos que houve introdução do butirato na dieta ocorreu redução significativa do pH

duodenal. Contudo, a inclusão de 0,7 g/Kg de butirato, demonstrou melhores resultados em comparação aos demais tratamentos. Quando o pH está acima de 5,0, bactérias patogênicas se multiplicam com facilidade, em contrapartida, quando o pH se encontra entre 3,5 a 4,0 as bactérias tidas como benéficas apresentam desenvolvimento favorecido (GRECCO, 2013; BLANCHARD, 2000).

Encontra-se poucos relatos na literatura sobre o uso de butirato para cães. Em um único trabalho encontrado, os autores demonstram que nas doses de 0,5% na dieta de cães adultos saudáveis, o butirato não exerceu não teve efeito sobre o índice de consistência fecal, teor de matéria seca e produção fecal, nos sobre os coeficientes de digestibilidade, nem sobre a excreção de AGCC (HESTA; ARNOUTS; JANSSENS, 2008). Percebe-se através deste levantamento bibliográfico que há necessidade de realizar mais estudos a respeito da interação entre as fontes de butirato e o metabolismo de animais de companhia.

REFERÊNCIAS

- AL-RASHIDI, H. E. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1628-1643, 2022.
- ABDEL-TAWWAB, M. et al. Effects of yucca, *Yucca schidigera*, extract and/or yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as water additives on growth, biochemical, and antioxidants/oxidant biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 533, n. 1, p. 736122, 2021.
- ADEBOWALE, T. O.; YAO, K.; OSO, A. O. Major cereal carbohydrates in relation to intestinal health of monogastric animals: A review. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 4, p. 331-339, 2019.
- AHSAN, U. et al. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 2, p. 265-275, 2016.
- AIYUK, S. et al. Removal of ammonium nitrogen from pretreated domestic sewage using a natural ion exchanger. **Environmental Technology**, v. 25, n. 11, p. 1321-1330, 2004.
- ALMIRALL, M. et al. The differences in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 4, p. 947-955, 1995.
- 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.
- ANDREESEN, J. R., BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. (1989). 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.
- 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.
- 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.
- CHEEKE, Peter Robert. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. In: **Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants**, p. 241-254, 2000.
- CHERRINGTON, C. A. et al. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n. 2, p. 161-165, 1991.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

CLEMENTE, J. C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

CONWAY, P. L. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. **Publication-European Association For Animal Production**, v. 80, p. 231-231, 1994.

COOMBS, D. S. et al. Recommended nomenclature for zeolite minerals: report of the subcommittee on zeolites of the International Mineralogical Association, Commission of New Minerals and Mineral Names. **Mineralogical Society**, v. 4, p. 533-571, 1997.

CRITTENDEN, S. L. et al. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cell in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 417, n. 6889, p. 660-663, 2002.

CUMMINGS, J. H. et al. PASSCLAIM1—Gut health and immunity. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 2, p. ii118-ii173, 2004.

DAS, T. K. et al. Saponin: Role in animal system. **Veterinary World**, v. 5, n. 4, p. 248-254, 2012.

DAWOOD, M. A. O. et al. The regulatory roles of yucca extract on the growth rate, hepato-renal function, histopathological alterations, and immune-related genes in common carp exposed with acute ammonia stress. **Aquaculture**, v. 534, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736287>. Acesso em: 05 dez. 2022.

DE ANGELIS, M. et al. Effect of whole-grain barley on the human fecal microbiota and metabolome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 22, p. 7945-7956, 2015.

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.

DONGOWSKI, G. et al. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3704-3714, 2002.

DRZIKOVA, B.; DONGOWSKI, G.; GEBHARDT, E. Dietary fibre-rich oat-based products affect serum lipids, microbiota, formation of short-chain fatty acids and steroids in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 6, p. 1012-1025, 2005.

DUNCAN, S. H. et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 2112-2122, 2009.

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.

- ELLIOT, A. D.; ZHANG, D. Controlled release zeolite fertilisers: a value-added product produced from fly ash. 1 ed. Australia: **Curtin University of Technology**. 2005. 32 p.
- EL-WAHAB, A. et al. Effect of dietary supplementation of calcium butyrate on growth performance, carcass traits, intestinal health and pro-inflammatory cytokines in Japanese quails. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, v.103, n. 6, p. 1768-1775, 2019.
- ENGLERT, A. H.; RUBIO, J. Characterization and environmental application of a Chilean natural zeolite. **International Journal of Mineral Processing**, v. 75, n. 1-2, p. 21-29, 2005.
- 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.
- FEHLBAUM, Sophie et al. In vitro fermentation of selected prebiotics and their effects on the composition and activity of the adult gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3097, 2018.
- FERREIRA, L. G. et al. Oat beta-glucan as a dietary supplement for dogs. **PLOS one**, v. 13, n. 7, p. e0201133, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201133>. Acesso em: 05 dez. 2022.
- FINOTELLO, F; TRAJANOSKI, Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1031-1040, 2018.
- GALFI, P.; BOKORI, J. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 38, n. 1-2, p. 3-17, 1990.
- 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.
- GRAHAM, H.; ÅMAN, P. Nutritional aspects of dietary fibres. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1-3, p. 143-158, 1991.
- GRECO, D. S. Probiotic and Prebiotic Therapy in Small Animals. **Planta Medica**, v. 79, n. 10, p. IL25, 2013.
- GUILLOTEAU, P. et al. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 366-384, 2010.
- GUMBS, Rikki et al. Global priorities for conservation of reptilian phylogenetic diversity in the face of human impacts. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2616, 2020.
- HAGERTY, Sarah 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.

HAJATI, H.; REZAEI, M. The application of prebiotics in poultry production. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 298-304, 2010.

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.

HARALAMPIDIS, K.; TROJANOWSKA, M.; OSBOURN, A. E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. **History and trends in bioprocessing and biotransformation**, v. 75, p. 31-49, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1007/3-540-44604-4_2. Acesso em: 05 dez. 2022.

HEADON, D.; DAWSON, K. Yucca extract controls atmospheric ammonia levels. **Feedstuffs**, v. 62, n. 29, p. 15-16, 1990.

HESTA, M.; ARNOUITS, S.; JANSSENS, G. 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.

HOODA, S. et al. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. **Animal health research reviews**, v. 13, n. 1, p. 78-88, 2012.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Saponins. **(No Title)**, 1995.

IEBBA, V. et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 1-12, 2016.

JASKARI, J. et al. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 175-181, 1998.

JAYACHANDRAN, M. et al. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 101-110, 2018.

KATSUNUMA, Y. et al. Effect of *Yucca shidigera* extract and saponins on growth of bacteria isolated from animal intestinal tract. **Nihon Chikusan Gakkaiho**, v. 71, n. 2, p. 164-170, 2000.

KONTULA, P. et al. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 246-252, 1998.

KROUPINA, K.; BÉMEUR, C.; ROSE, C. F. Amino acids, ammonia, and hepatic encephalopathy. **Analytical biochemistry**, v. 649, p. 114696, 2022.

LAM, K.-L. et al. In vitro fermentation of beta-glucans and other selected carbohydrates by infant fecal inoculum: An evaluation of their potential as prebiotics in infant formula. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 14, p. 20-24, 2018.

LEE, Bonggi et al. Tight junction in the intestinal epithelium: its association with diseases and regulation by phytochemicals. **Journal of immunology research**, v. 2018, 2018.

LI, S. et al. Dietary supplementation with *Yucca schidigera* extract alleviated heat stress-induced unfolded protein response and oxidative stress in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 219, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112299>. Acesso em: 05 dez. 2022.

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

LITVAK, Y.; BYNDLOSS, M. X.; BÄUMLER, A. J. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. **Science**, v. 362, n. 6418, 2018.

LOBIONDA, S. et al. The role of gut microbiota in intestinal inflammation with respect to diet and extrinsic stressors. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 271, 2019.

LUZ, A. B. **Zeólitas: propriedades e usos industriais**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, p.35, 1995.

LYNCH, J. B.; HSIAO, E. Y. Microbiomes as sources of emergent host phenotypes. **Science**, v. 365, n. 6460, p. 1405-1409, 2019.

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.

MIKKELSEN, M. S.; JENSEN, M. G.; NIELSEN, T. S. Barley beta-glucans varying in molecular mass and oligomer structure affect cecal fermentation and microbial composition but not blood lipid profiles in hypercholesterolemic rats. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4723-4732, 2017.

MING, D. W.; MUMPTON, F. A. **Zeolites in soils**. In: Minerals in Soil Environments: wiley, 1989. p. 873-911.

MITSOU, E. K. et al. Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1086-1092, 2010.

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.

NAKHLI, S. A. A. et al. Application of Zeolites for Sustainable Agriculture: A Review on Water and Nutrient Retention. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 228, n. 12, 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dogs and cats. 2nd ed. Washington (DC): National Academy Press. 2006.

OBER, J. A. **Mineral commodity summaries 2016**. US Geological Survey. 2016.

OKUMURA; T. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 5, p. e338, 2017.

PALMQVIST, H. et al. Effects of rye inclusion in dog food on fecal microbiota and short-chain fatty acids. **Research Square**, 2022. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1411694/v1>. Acesso em: 05 dez. 2022.

PEREZ-LOPEZ, A. et al. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 135-148, 2016.

PILLA, R.; SUCHODOLSKI, J. S. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00498>. Acesso em: 05 dez. 2022.

PROHASZKA, L. et al. The role of intestinal volatile fatty acids in the Salmonella shedding of pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1-10, p. 570-574, 1990.

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.

RENZ, H; BRANDTZAEG, P; HORNEF, M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 1, p. 9-23, 2012.

RIDDER, L. et al. Effect of a DIVA vaccine with and without in-feed use of coated calcium-butyrate on transmission of *Salmonella Typhimurium* in pigs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2013.

RINKE, C. et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 431-437, 2013.

SABBIONI, A. et al. Modulation of the bifidobacterial communities of the dog microbiota by zeolite. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01491>. Acesso em: 05 dez. 2022.

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.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-594, 2008.

SCHNEIDER, A. F.; ZIMMERMANN, O. F.; GEWEHR, C. E. Zeolites in poultry and swine production. **Ciência Rural**, v. 47, n. 8, 2017.

SHEN, R.-L. et al. Effects of oat soluble and insoluble β -glucan on 1, 2-dimethylhydrazine-induced early colon carcinogenesis in mice. **Food and Agricultural Immunology**, v. 27, n. 5, p. 657-666, 2016.

SHOUKAT, M.; SORRENTINO, A. Cereal β -glucan: a promising prebiotic polysaccharide and its impact on the gut health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 2088-2097, 2021.

SMITH, E. A.; MACFARLANE, G. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. **Anaerobe**, v. 3, n. 5, p. 327-337, 1997.

SU, Xiaoquan. Elucidating the Beta-Diversity of the microbiome: from global alignment to local alignment. **Msystems**, v. 6, n. 4, p. e00363-21, 2021.

SUCHODOLSKI, J. S. et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51907, 2012.

SUTTON, A. L. et al. Effects of odor control compounds on urease activity in swine manure. **Journal Animal Science**, v. 70, n. Suppl 1, p. 160, 1992.

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.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

VELIKONJA, A. et al. Alterations in gut microbiota composition and metabolic parameters after dietary intervention with barley beta glucans in patients with high risk for metabolic syndrome development. **Anaerobe**, v. 55, p. 67-77, 2019.

VIERBAUM, L. et al. In vitro evaluation of the effects of *Yucca schidigera* and inulin on the fermentation potential of the faecal microbiota of dogs fed diets with low or high protein concentrations. **Archives of Animal Nutrition**, v. 73, n. 5, p. 399-413, 2019.

VINCKEN, J. P. et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275-297, 2007.

WANG, A. et al. Sodium butyrate mitigates in vitro ammonia generation in cecal content of laying hens. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 16, p. 16272-16279, 2016.

WANG, J. et al. Efficacy of New Zeolite-based Hemostatic Gauze in a Gunshot Model of Junctional Femoral Artery Hemorrhage in Swine. **Journal of Surgical Research**, v. 263, p. 176-185, 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.

WU, Q. J. et al. Effects of clinoptilolite and modified clinoptilolite on the growth performance, intestinal microflora, and gut parameters of broilers. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 684-692, 2013.

YANG, Z. et al. Effects of Dietary *Yucca Schidigera* Extract and Oral *Candida utilis* on Growth Performance and Intestinal Health of Weaned Piglets. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 233, 2021.

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.

ZHU, Y. et al. Effects of oat β -glucan, oat resistant starch, and the whole oat flour on insulin resistance, inflammation, and gut microbiota in high-fat-diet-induced type 2 diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 69, p. 103939, 2020.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO – ADIÇÃO DE ZEÓLITA, YUCCA, BETAGLUCANO E BUTIRATO DE CÁLCIO EM DIETAS SECAS PARA CÃES: EFEITOS SOBRE O MICROBIOMA**

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

ADIÇÃO DE ZEÓLITA, YUCCA, BETAGLUCANO E BUTIRATO DE CÁLCIO EM DIETAS SECAS PARA CÃES: EFEITOS SOBRE O MICROBIOMA

Gustavo A. Igaki*, Lucas D. L. Santos*, Flávia M. O. B. Saad*, Luciana P. Naves*, Vanessa A. Silva*, Mateus P. Santos*, Maria R. C. Godoy^{†#}

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

† Department of Animal Sciences, 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: Aditivos como zeólita, extrato de *Yucca schidigera*, beta-glucanos e butirato de cálcio podem contribuir para a saúde intestinal dos cães, auxiliando na redução do odor fecal, estimulando o sistema imunológico e fornecendo energia para os enterócitos. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação conjunta da zeólita clinoptilolita (ZC), *Yucca schidigera* (YSE), β -glucanos de algas e butirato de cálcio (BC) no microbioma fecal dos cães. Utilizando um delineamento experimental em blocos casualizados, 15 cães, machos e fêmeas, com idade média de $6 \pm 0,14$ anos, foram divididos aleatoriamente em cinco grupos durante três períodos, totalizando nove repetições por tratamento. Os tratamentos foram: controle (T0), T0 + 0,75% de ZC (T1), T0 + 0,75% ZC + 0,1% de YSE (T2), T0 + 0,75% de ZC + 0,1 YSE + 0,03% de β -Glucanos (T3) e T0 + 0,75% de ZC + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de BC (T4). Não houve diferenças significativas na alfa e beta diversidade dos microrganismos encontrados nas fezes dos cães alimentados com diferentes tratamentos. No entanto, todos os tratamentos apresentaram uma alta α -diversidade, indicando um estado de eubiose. Os filos predominantes

encontrados foram Firmicutes (51,34-62,36%), Bacteroidota (17,17-22,59%), Fusobacteria (13,29-20,35%), Actinobacteriota (2,21-4,89) e Proteobacteria (2,27-4,28%). Dentro do filo Firmicutes houve prevalência do gênero *Allobaculum*, relacionado à produção de ácido butírico. Com relação ao filo Bacteroidota, o gênero *Prevotella* apresentou alta abundância relativa. Portanto, a inclusão de ZC, YSE, B-glucanos e BC proporcionou um ambiente intestinal em eubiótico e pode ser uma boa alternativa para o mercado pet food.

Palavras-chave: Eubiose, Aditivos, Saúde Intestinal.

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo e diversificado de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal. A eubiose é um estado de equilíbrio saudável dessa microbiota, onde há uma predominância de bactérias benéficas que contribuem para a saúde geral do indivíduo. Este equilíbrio é crucial para a digestão eficiente dos nutrientes, pois certas bactérias na microbiota desempenham um papel vital na quebra de compostos complexos em formas mais simples que podem ser absorvidas pelo corpo. Além disso, a microbiota intestinal também desempenha um papel fundamental na imunologia do indivíduo. Ela ajuda a regular a resposta imune, protegendo contra patógenos invasores e prevenindo respostas imunes excessivas que podem levar a doenças autoimunes. Portanto, manter a eubiose é essencial para a saúde digestiva e imunológica.

A alimentação tem um papel fundamental na modulação da microbiota intestinal em cães. A fibra dietética, por exemplo, é fermentada pelas bactérias intestinais em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são benéficos para a saúde intestinal. Além disso, a fermentação da fibra pode promover o crescimento de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, melhorando assim a eubiose. Por outro lado, a fermentação de proteínas na dieta pode levar à produção de compostos indesejáveis, como amônia, aminas e ácidos graxos de cadeia ramificada, que podem contribuir para o odor fecal. Portanto, é importante equilibrar a quantidade de proteína na dieta para garantir uma boa saúde intestinal e minimizar o odor fecal. Portanto, a escolha da dieta pode ter um impacto significativo na microbiota intestinal dos cães e, conseqüentemente, em sua saúde geral.

A zeólita, o extrato de *Yucca schidigera*, os beta-glucanos e o butirato de cálcio são aditivos alimentares importantes na dieta dos cães. A zeólita tem a capacidade de se ligar à amônia, ajudando a reduzir o odor fecal. O extrato de *Yucca schidigera* também é conhecido por sua capacidade de reduzir o odor fecal, além de possuir propriedades anti-inflamatórias. Os beta-glucanos são polissacarídeos que podem estimular o sistema imunológico e melhorar a saúde intestinal. O butirato de cálcio é uma fonte de energia para os enterócitos e pode melhorar o desenvolvimento das vilosidades intestinais. Esses aditivos, juntamente com uma dieta equilibrada, podem ajudar a promover uma microbiota intestinal saudável em cães, melhorando a digestão e a saúde geral do animal.

Embora alguns ingredientes já sejam amplamente utilizados na indústria de alimentos para cães e gatos, é importante entender como eles atuam em conjunto para manter um microbioma eubiótico em cães. Portanto, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos sinérgicos da adição de zeólita clinoptilolita (ZC), *Yucca schidigera* (YSE), β -glucanos e butirato de cálcio (BC) no microbioma fecal dos cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos de cuidados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (Protocolo nº. 007/22).

Animais e dietas

O estudo foi conduzido no CENAC (Centro de Nutrição de Animais de Companhia) na Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras – MG. Foram utilizados 15 cães, machos e fêmeas, com idade média de $6 \pm 0,14$ anos, sendo cinco beagles e 10 sem raça definida, com peso médio de $14,5 \pm 0,20$ e $17,5 \pm 0,15$ e escore médio de condição corporal de $5,4 \pm 0,4$ usando uma escala de nove pontos (Laflamme, 1997). Os cães foram alojados individualmente em baias (1,5 m de largura x 3,0 m de comprimento) de cimento com acesso ao solário. Os bebedouros utilizados foram do tipo nipple, fixados na parede do fundo da baia a uma altura média de 50 centímetros do solo. O peso corporal e o escore de condição corporal foram registrados semanalmente, e a ingestão alimentar foi registrada diariamente. As necessidades energéticas dos cães foram calculadas seguindo as recomendações do NRC (2006) utilizando a fórmula $110 \times PV^{0,75}$, portanto os animais foram alimentados para manter o peso corporal e o escore de condição corporal ideais durante todo o estudo.

Foram utilizados cinco tratamentos, sendo: tratamento controle, sem nenhum aditivo (T0); T0 + 0,75% de ZC (T1); T0 + 0,75% ZC + 0,1% de YSE (T2); T0 + 0,75% de ZC + 0,1 de YSE + 0,03% de β -Glucanos (T3); e T0 + 0,75% de ZC + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de BC (T4). Todas as dietas foram formuladas com composição química e ingredientes semelhantes seguindo a recomendação do NRC (2006) para cães adultos, exceto pela adição dos diferentes tipos de *blend* por tratamento de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Níveis de garantia das dietas experimentais na matéria seca.

Nutrientes*	Tratamentos ¹				
	T0	T1	T2	T3	T4
Umidade (max) (%)	10	10	10	10	10
Proteína Bruta (Mín.) (%)	22	22	22	22	22
Extrato Etéreo (Mín.) (%)	10	10	10	10	10
Matéria Fibrosa (Máx.) (%)	4	4	4	4	4
Matéria Mineral (Máx.) (%)	9	9	9	9	9
Cálcio (Mín - Máx.) (%)	1,6 - 2,2	1,6 - 2,2	1,6 - 2,2	1,6 - 2,2	1,6 - 2,2
Fósforo (Mín.) (%)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Ácido Linoléico (Mín.) (%)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Ácido Linolênico (Mín.) (%)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Sódio (Mín.) (%)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Potássio (Mín.) (%)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Blend**					
Zeólita (%)	-	0,75	0,75	0,75	0,75
<i>Yucca Schidigera</i> (%)	-	-	0,10	0,10	0,10
β -Glucanos (%)	-	-	-	0,03	0,03
Butirato de Calcio (%)	-	-	-	-	0,5

*Composição básica do alimento: Arroz Quirera, Farinha de Carne e Ossos Bovino, Farinha de Visceras de Frango, Milho Integral Moído, Gordura de Frango, Hidrolisado de Carne e Frango, Semente de Linhaça (0,4%), Farelo de Trigo, Hemácias, Cloreto de Colina, Cloreto de Potássio, Antioxidante (BHT e BHA), Aditivo Antifúngico (Ácido Propiônico), Cloreto de Sódio (Sal Comum), L-Lisina, Biotina.

Composição dos aditivos utilizados: **Yucca schidigera: 5% de saponinas; **β -Glucanos**: $\geq 50\%$ de 1,3 β -Glucanos; **Butirato de cálcio**: 85% de butirato de cálcio.

¹ Tratamentos:

T0: Sem adição de aditivos (dieta controle);

T1: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita;

T2: dieta controle + 0,75% zeólita clinoptilolita + 0,1% de YSE;

T3: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos;

T4: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de butirato de cálcio protegido.

Delineamento experimental e coleta de amostras

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), sendo bloqueado o período. Os cães foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, contendo três animais, durante três períodos, totalizando nove repetições por tratamento.

Nos primeiros sete dias de cada período experimental, todos os animais consumiram o tratamento controle, a partir do dia 8 até o dia 28 os animais receberam os alimentos experimentais. No dia 28 dia foi realizada a coleta de fezes para a realização da microbiota fecal.

Microbiota fecal: extração de DNA, amplificação, sequenciamento e bioinformática

Extração do DNA fecal foi feita utilizando o kit comercial Mo-Bio PowerSoil (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América). A concentração de DNA foi determinada pelo fluorímetro 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) e 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%. 85 Singletons (OTUs que foram observados menos de 2 vezes) e OTUs que representavam menos de 0,01% foram descartados. Um total de 1.353.878 sequências foram obtidas, média de 32,235 e intervalo = 19,737-57.888

sequências por amostra. Rarefacção foi feita, para análise de diversidade alpha e beta, mantendo 19,730 sequências por amostra. A análise das coordenadas principais (PCoA) foi realizada, usando distâncias métricas de fração únicas ponderadas e não ponderadas (UniFrac) (LEY et al., 2005).

Análises Estatísticas

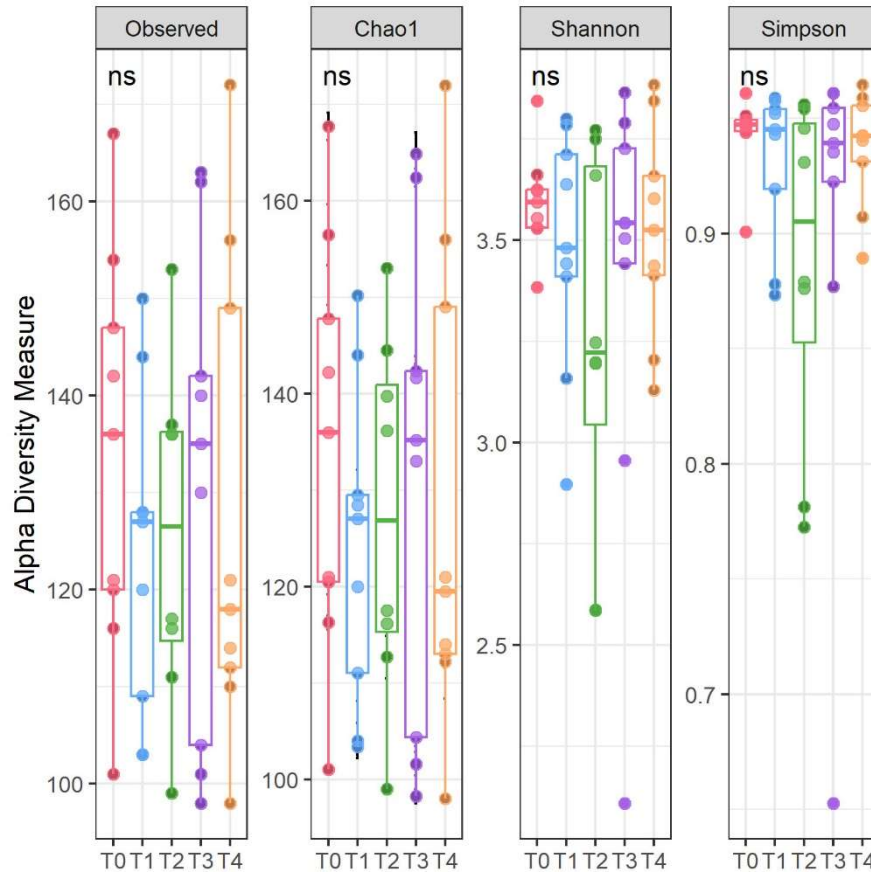
A tabela de recursos resultante, a árvore enraizada da filogenia reconstruída e a classificação taxonômica foram importadas do ambiente QIIME2 para R v4.1.2 para posterior análise de dados usando os pacotes Microbiome v1.16.0 e Phyloseq v1.38.0 R (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Para a análise taxonômica, a tabela de recursos foi transformada em dados de composição para visualização da composição do gráfico de barra de táxons dos 10 gêneros mais abundantes usando a função de composição do gráfico do pacote Microbiome R. A significância da diversidade alfa foi estimada usando um teste de Kruskal, usando a função do pacote Microbiome R e a ordenação MDS foi aplicada às métricas de diversidade beta escolhidas usando a função de ordenação de plotagem do pacote Phyloseq em R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da microbiota fecal de cães, utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, após a suplementação de zeólita clinoptilolita, *Yucca schidigera*, β -glucanos e butirato de cálcio, não revelou diferenças significativas ($P>0,05$) em relação entre os grupos, tanto em termos de diversidade microbiana. Esses resultados indicam que a inclusão dos mencionados aditivos nas dietas, em concentrações de 0,75%, 0,1%, 0,03% e 0,5%, respectivamente, não exerceu qualquer efeito sobre a diversidade da comunidade microbiana (Figuras 1, 2A e 2B), não havendo diferenças em relação à abundância e à presença de diferentes taxas (Figuras 2A e 2B).

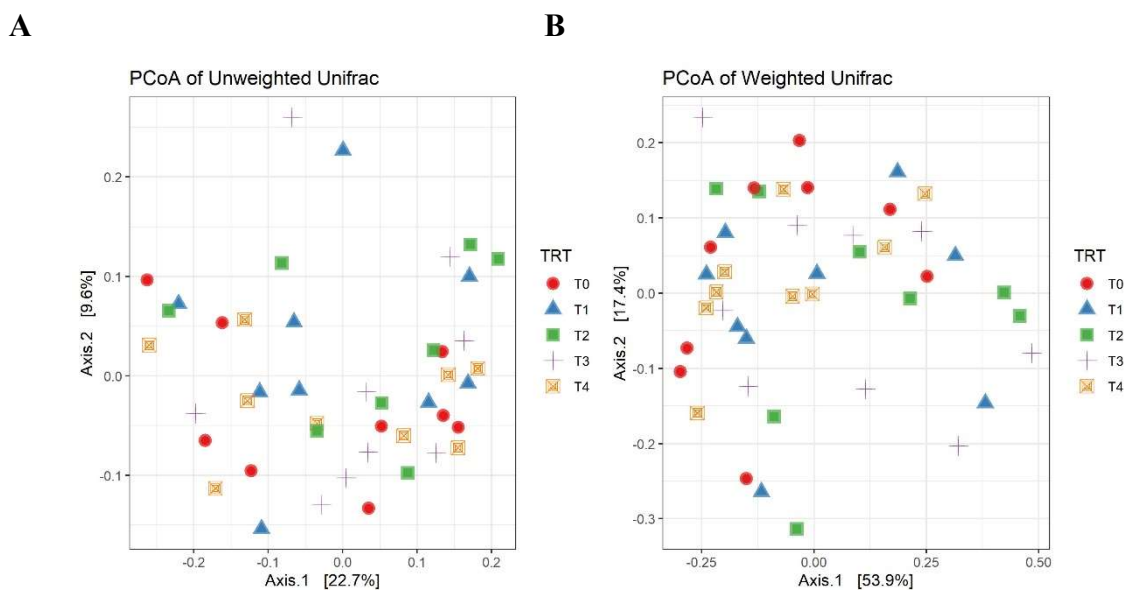
Figura 1 - Análise de alfa-diversidade das comunidades microbianas fecais, medida pela diversidade filogenética de Chao1, Shannon e Simpson, de cães alimentados com dietas contendo de zeólita clinoptilolita, *Yucca schidigera*, β -glucanos e butirato de cálcio.



Legenda: T0: Sem adição de aditivos (dieta controle); T1: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita; T2: dieta controle + 0,75% zeólita clinoptilolita + 0,1% de YSE; T3: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos; T4: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de butirato de cálcio protegido

No presente estudo, a α -diversidade (Figura 1) encontrada foi medida utilizando um estimador de riqueza (Chao1) e os índices de diversidade de Shannon e Simpson. A alfa diversidade refere-se à diversidade de espécies dentro de uma única amostra ou habitat. Se trata de uma medida da riqueza (número de espécies) e uniformidade (distribuição das espécies) da microbiota em um único ambiente, como o intestino de um indivíduo. Uma alta alfa diversidade geralmente indica um estado de eubiose, pois sugere uma comunidade microbiana rica e equilibrada, capaz de resistir a perturbações e desempenhar suas funções metabólicas e imunológicas de maneira eficaz (GONG et al., 2016; LI et al., 2022).

Figura 2 - Análise de beta-diversidade das comunidades microbianas fecais de cães alimentados com dietas contendo zeólita clinoptilolita, *Yucca schidigera*, β -glucanos e butirato de cálcio.



Legenda: (A) Gráficos principais coordenados das distâncias não ponderadas de UNIFRAC das comunidades microbianas fecais. (B) Gráficos principais coordenados das distâncias ponderadas de UNIFRAC das comunidades microbianas fecais.

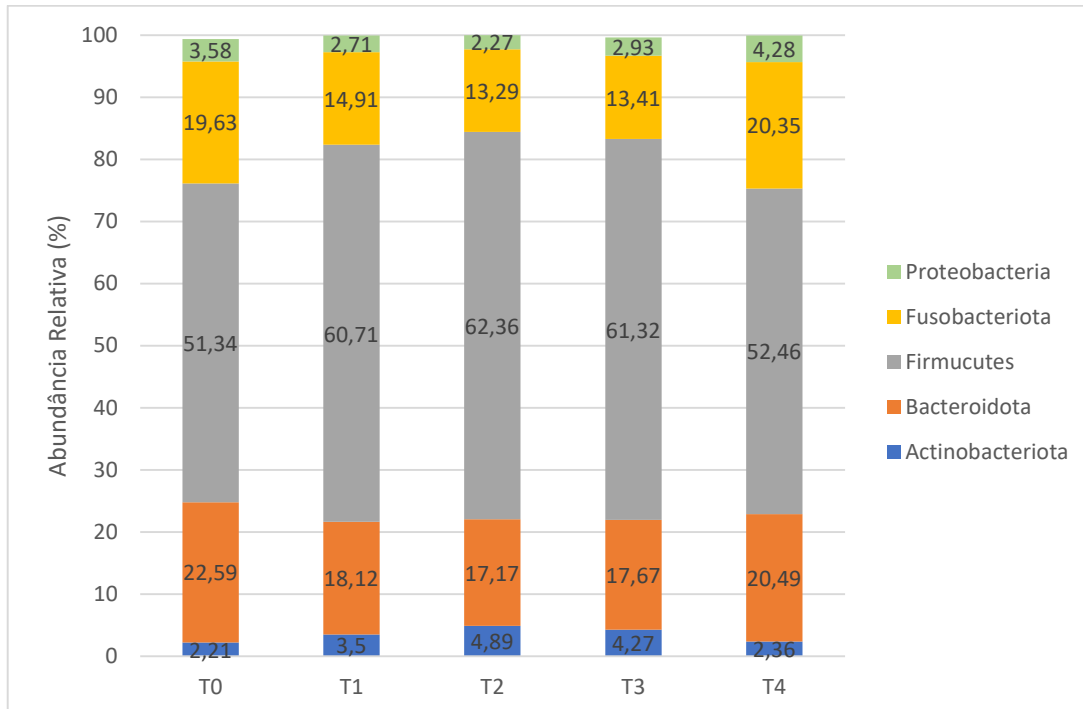
Com relação a β -diversidade (Figuras 2A e 2B), a adição de diferentes fontes de aditivos à dieta controle não causou alterações na diversidade microbiota intestinal dos cães, como demonstrado pela falta de agrupamento distintos das amostras fecais nos gráficos de PCoA. Isto é indicativo que a ZC, YSE, BG e BC nas proporções utilizadas não ocasionam diminuição da diversidade populacional de microrganismos no IG. A β -diversidade reflete a variação na composição da microbiota entre diferentes indivíduos ou entre diferentes estados de saúde e doença no mesmo indivíduo. Um valor mais próximo de zero para a β -diversidade entre indivíduos saudáveis pode indicar um estado de eubiose, pois sugere que há uma composição “ideal” de microbiota que é compartilhada entre indivíduos saudáveis (SU, 2023).

Os resultados encontrados para α -diversidade corroboram com Sabbione et al. (2016), que estudaram a adição de 5 g/dia de zeólita chabazita em dietas de cães. Os autores relatam que o estimador de riqueza Chao1 foi adequado para englobar a maioria da biodiversidade contida nas amostras, contudo não observaram diferenças significativas para a riqueza da comunidade bacteriana entre grupo tratado com zeólita e o não tratado, indicando que as amostras analisadas possuem biodiversidade semelhante. Apesar do índice de Chao1 não ter diferido entre os dois tratamentos, ocorreu o aumento na abundância relativa de espécies do

gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e diminuição de espécies da família *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* e *C. perfringens* quando os cães consumiram a dieta contendo zeólita. Resultados semelhantes foram encontrados quando Superchi et al. (2016) trabalhou com a mesma fonte e inclusão de zeólita. Os autores correlacionaram a redução das espécies da família *Enterobacteriaceae* (filo Proteobacteria) à capacidade de troca catiônica que as zeólitas possuem, uma vez que, a parede celular bacteriana, em condições fisiológicas, apresenta cargas negativas e a estrutura da zeólita chabazita apresentam cargas positivas (GUOET al., 2011; SUPERCHI et al., 2016)

No presente estudo não foi constatado diferenças significativas na abundância relativa de microrganismos a partir da inclusão de 0,75% de ZC (Quadro 1, Figuras 3 e 4). Na literatura, encontram-se poucos artigos que avaliaram a inclusão de zeólitas e seus efeitos na microbiota fecal de cães. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para que a ação da zeólita no microbioma de cães possa ser melhor compreendida.

Figura 3 - Principais filos bacterianos (expressos como porcentagem do total de sequências) em amostras fecais de cães adultos alimentados diferentes tratamentos com diferentes aditivos.



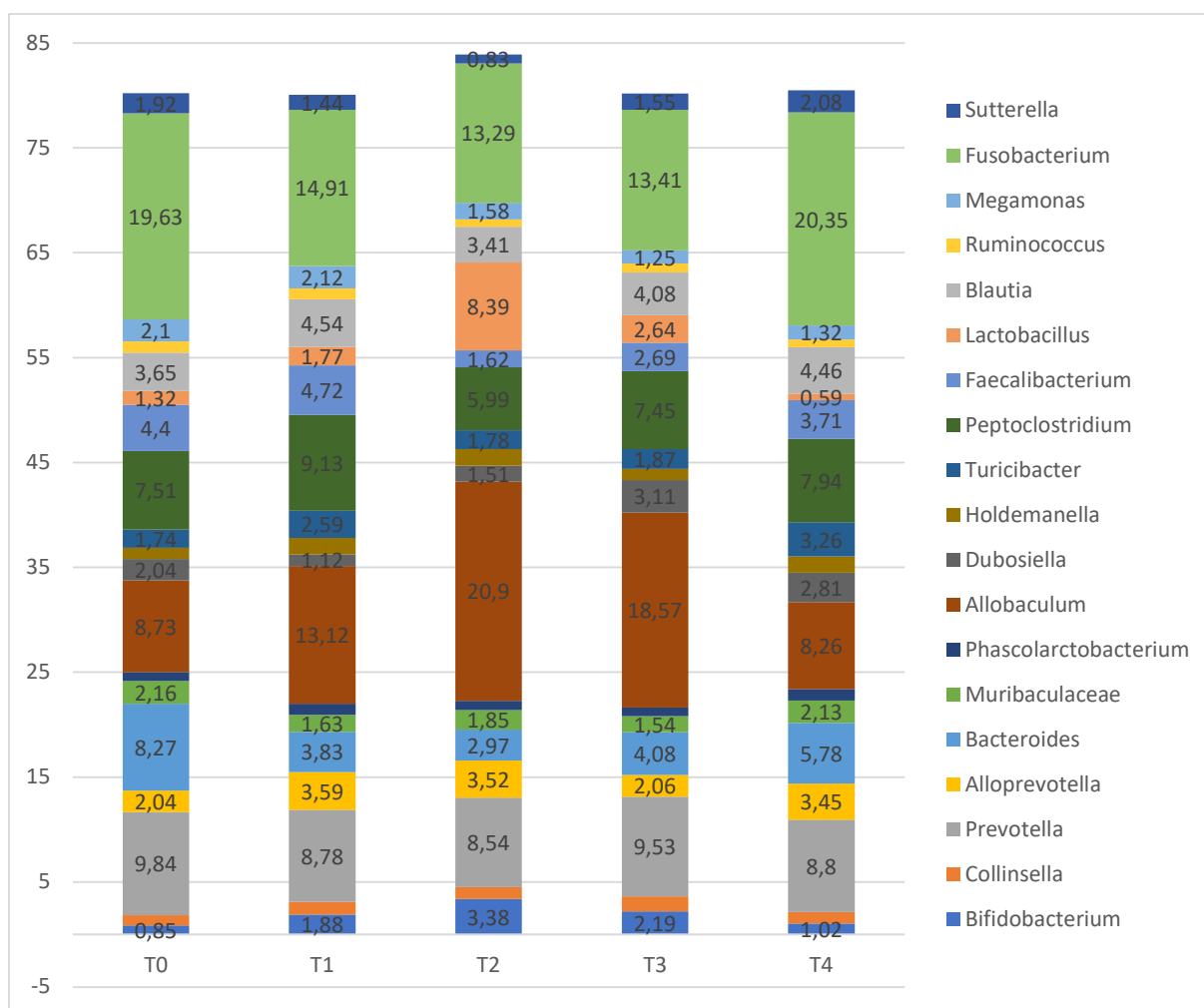
Legenda: T0: Sem adição de aditivos (dieta controle); T1: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita; T2: dieta controle + 0,75% zeólita clinoptilolita + 0,1% de YSE; T3: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos; T4: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de butirato de cálcio protegido

A adição de 0,1% de YSE não alterou a abundância relativa de microrganismos presentes no IG de cães. Assim como a ZC, na literatura encontram-se poucos trabalhos com cães a respeito do efeito desse ingrediente no microbioma fecal. O YSE contém uma quantidade significativa de saponinas, que são compostos frequentemente utilizados na alimentação de ruminantes como alternativa aos antibióticos. Estudos anteriores indicaram que essas moléculas possuem propriedades antimicrobianas, alteram a fermentação no rúmen, reduzem a quantidade de protozoários ruminais e diminuem a emissão de metano entérico (WANG et al., 2012; WANG et al., 2019). No entanto, quando se trata de animais monogástricos, os efeitos da modulação da microbiota intestinal pelo YSE ainda são pouco compreendidos. Neste estudo em particular, a inclusão do YSE na dieta de leitões desmamados não demonstrou efeitos significativos na abundância relativa dos filos Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. Isso sugere que, nas condições avaliadas, o YSE não teve um impacto pronunciado na composição da microbiota intestinal desses animais.

As formas salinas do ácido butírico são amplamente empregadas na alimentação de animais devido ao odor característico associado a esse aditivo (GÜMÜS et al., 2020). Um dos compostos mais utilizados nesse contexto é o butirato de cálcio, que desempenha um papel crucial como fonte de energia para as células intestinais, contribuindo para o desenvolvimento saudável das vilosidades intestinais (EL-WAHAB et al., 2019). Além disso, o butirato de cálcio é conhecido por reduzir o pH da mucosa intestinal, criando um ambiente favorável para o crescimento de bactérias benéficas (AHSAN et al., 2016; EL-WAHAB et al., 2019).

Embora exista uma ampla gama de estudos sobre o uso de butirato em diferentes espécies, há poucos relatos na literatura sobre o uso desse aditivo em dietas para cães. Apenas um estudo encontrado na literatura investigou os efeitos do butirato em cães adultos saudáveis, utilizando uma concentração de 0,5% na dieta (HESTA; ARNOOTS; JANSSENS, 2008). Os resultados indicaram que o butirato não teve efeito significativo sobre a excreção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e não teve efeito significativo na abundância relativa *Lactobacillus* e *E. coli*. Estes achados, corroboram com os resultados encontrados neste estudo e sugerem a necessidade de mais pesquisas para compreender melhor a influência do butirato na fisiologia e saúde dos cães.

Figura 4 - Principais famílias bacterianas (expressos como porcentagem do total de sequências) em amostras fecais de cães adultos alimentados diferentes tratamentos com diferentes aditivos.



Legenda: T0: Sem adição de aditivos (dieta controle); T1: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita; T2: dieta controle + 0,75% zeólita clinoptilolita + 0,1% de YSE; T3: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos; T4: dieta controle + 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de butirato de cálcio protegido

Segundo Grzeskowiak et al. (2015), os cinco filos predominantes em cães e gatos são os Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria e Fusobacteria. Pilla e Suchodolski (2019) relatam que a microbiota fecal de cães saudáveis é caracterizada por uma co-dominância de três filos bacterianos proeminentes: Firmicutes, Fusobacterium e Bacteroidotas. Os filos predominantes, observados neste estudo foram Firmicutes (51,34-62,36%), Bacteroidota (17,17-22,59%), Fusobacteria (13,29-20,35%), Actinobacteriota (2,21-4,89) e Proteobacteria (2,27-4,28%) (Figura 3; Quadro 1). Diversos trabalhos corroboram com os resultados encontrados nesse estudo. Deng e Swanson (2015) encontraram de forma predominante os filos Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria, Fusobacteria, e Actinobacteria no TGI de cães. Em outro estudo

foi utilizado diferentes níveis (7,5% e 15%) de três tipos de farinhas de insetos (barata de Madagascar, barata cinéria e tenébrio gigante) no microbioma de cães. Os resultados revelaram que os filos bacterianos predominantes, identificados em todos os cães, foram Firmicutes (29,9-44,1%), Bacteroidota (19,1-24,3%), Fusobacteria (13,4-44,5%) e Proteobacteria (2,5-5,5%) (LISENKO, 2017).

Um estudo recente, utilizou cães para comparar a mudança de dieta, sendo utilizado a ração extrusada por três meses e posteriormente uma dieta de carne crua por 28 dias. Os autores observaram que o consumo de carne crua aumentou a abundância relativa de Fusobacteria e Bacteroidetes e diminuiu a abundância relativa de Firmicutes nas três primeiras semanas (XU et al. 2021). Desta forma, um dos motivos pela maior abundância relativa do filo Firmicutes encontra neste estudo pode estar correlacionada com a quantidade de extrativo não-nitrogenado, em torno de 44%.

No presente estudo, os gêneros com maior abundância relativa encontrados dentro do filo Firmicutes foram o *Allobaculum* e *Peptoclostridium* (Figura 4). As células das bactérias do gênero *Allobaculum* são chamadas de alobaculo, são Gram positivas, apresentam formação de bastonetes e estão relacionadas à produção de ácido butírico e com aumento da expressão de proteína semelhante à angiogenina 4 (ANGPTL4) que desempenha um papel importante na deposição de lipídios, inibindo a lipoproteína lipase para regular o metabolismo lipídico (ZHENG et al., 2021). *Blautia*, *Dorea* e *Faecalibacterium* também são representantes do filo Firmicutes e tem a capacidade de produção de AGCC (PRECUP; DAN-CRISTIAN, 2019). Segundo Precup e Dan-Cristian (2019), o ácido butírico é frequentemente produzido através da enzima butiril-CoA:acetato CoA-transferase, com o consumo de acetato, e é principalmente característico do filo Firmicutes. Contudo, bactérias de outros filos também estão relacionados a produção de butirato, como as bactérias *Bifidobacterium* (Actinobacteriota), *Bacteroides* (Bacteroidota).

Com relação ao filo Bacteroidota, na literatura é relatado que as bactérias do gênero *Bacteroides*, bem como as espécies do gênero *Bifidobacterium* (filo Actinobacteriota), são geralmente encontrados em maior quantidade em cães e gatos saudáveis (INNESS et al., 2007; GRZESKOWIAK et al., 2015). A relação Firmicutes/Bacteroidota é considerada um indicador de obesidade em humanos e animais (LEY et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2006; BAEK et al., 2023). Desta forma, os indivíduos obesos apresentam maior relação, enquanto os indivíduos magros apresentam maior composição de bactérias do filo bacteroidota. O gênero *Prevotella* apresentou alta abundância relativa no filo Bacteroidota (Figura 4). Este gênero contribui para

a fermentação de polissacarídeos, portanto estão relacionadas ao aumento de ácidos graxos de cadeia curta no colón intestinal (PRECUP; DAN-CRISTIAN, 2019), fato positivo no contexto de saúde intestinal, desta forma, a presença de bactérias deste gênero pode ser considerada um marcador de eubiose intestinal.

Em relação ao filo Fusobacteria o gênero *Fusobacterium* foi o mais expressivo (Figura 4). Bactérias deste gênero são Gram negativas e geralmente estão associadas a inflamação em humanos, como por exemplo, *Fusobacterium nucleatum* que está associada a apendicite, câncer de cólon e doença inflamatória intestinal (GU et al., 2020). Contudo em cães e outros animais carnívoros, o gênero *Fusobacterium* está associado a um microbioma saudável. Isto indica que estas bactérias exercem uma função diferente no TGI de cães quando comparado a humanos (PILLA; SUCHODOLSKI, 2020).

Santos (2023) trabalhando com doses semelhantes dos mesmos aditivos demonstrou alteração significativa nos valores de pH e acetato. Percebeu-se também uma tendência estatística nas concentrações de propionato e amônio fecal. Desta forma, percebeu-se que para a característica pH fecal os tratamentos que continham a inclusão de apenas 0,75% de zeólita clinoptilolita, 0,75% zeólita clinoptilolita associada a 0,1% de YSE e 0,75% de zeólita clinoptilolita + 0,1% YSE + 0,03% de β -Glucanos + 0,5% de butirato de cálcio, apresentaram menor valor de pH.. Percebe-se que a redução do pH está intimamente relacionado aos filos Firmicutes e Actinobacteriota (Figura 5). Segundo Houtman et al. (2022), dentro do filo Firmicutes encontra-se bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que auxiliam na redução do pH intestinal. Um dos representantes do Filo Actinobacteriota são as bactérias *Bifidobacterium* que também são produtoras AGCC, principalmente o butirato (PRECUP; DAN-CRISTIAN, 2019; YOON et al., 2023).

Os resultados demonstram que a inclusão de blends contendo ZC, YSE, B-glucanos e BC não proporcionou diferença na microbiota intestinal de cães, no entanto, manteve o ambiente intestinal em eubiose, podendo ser incluídos em dietas para cães. É importante ressaltar que mais pesquisas são necessárias para entender completamente seus efeitos sobre o microbioma intestinal canino. Estudos futuros devem se concentrar em elucidar os mecanismos exatos pelos quais esses aditivos influenciam a microbiota intestinal e determinar as dosagens ideais para otimizar os benefícios à saúde.

REFERÊNCIAS

- Ahsan, U., Cengiz, Ö., Raza, I., Kuter, E., Chacher, M.F.A., Iqbal, Z., Umar, S. and Çakir, S., 2016. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. *World's Poultry Science Journal*, 72(2): 265-275. doi.org/10.1017/S0043933916000210
- Baek, G. H., Yoo, K. M., Kim, S. Y., Lee, D. H., Chung, H., Jung, S. C., Park, S-K. and Kim, J. S. (2023). Collagen Peptide Exerts an Anti-Obesity Effect by Influencing the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut. *Nutrients*, 15(11), 2610. doi.org/10.3390/nu15112610
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M. and Gormley, N., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8):1621-1624. doi.org/10.1038/ismej.2012.8
- Deng, P., and Swanson, K. S. 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*, 113(S1): S6-S17. doi.org/10.1017/S0007114514002943
- EL-Wahab, A. A., R. E. Mahmoud, M. F. E. Ahmed, and M. F. Salama. 2019. Effect of dietary supplementation of calcium butyrate on growth performance, carcass traits, intestinal health and pro-inflammatory cytokines in Japanese quails. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 103(6):1768-1775. doi: 10.1111/jpn.13172
- Gong, J., Qiu, W., Zeng, Q., Liu, X., Sun, X., Li, H., Yang, Y., Wu, A., Bao, J., Wang, Y., Shu, Y., Hu, X., Bellanti, J., Zheng, S, G., Lu, Y., and Lu, Z. (2019). 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*, 25(9):1316-1325. doi.org/10.1177/135245851879039
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., and Salminen, S. 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34: 14-23. doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002
- Gu, X., Song, L. J., Li, L. X., Liu, T., Zhang, M. M., Li, Z., Wang, P., Li, M., and Zuo, X. L. (2020). *Fusobacterium nucleatum* causes microbial dysbiosis and exacerbates visceral hypersensitivity in a colonization-independent manner. *Frontiers in microbiology*, 11, 1281. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01281
- Gümüş, E., S. Küçükersan, A. G. Bayraktaroğlu, and T. Sel. 2020. Effect of dietary supplementation of some natural antioxidants and coated calcium butyrate on carcass traits, some serum biochemical parameters, lipid peroxidation in meat and intestinal histomorphology in broilers. *Veteriner Fakültesi Dergisi*. 68(3):237-244. doi: 10.33988/auvfd.680747
- Guo, T., Cao, S., Su, R., Li, Z., Hu, P., and Xu, Z. 2011. Adsorptive property of Cu²⁺-loaded montmorillonite clays for *Escherichia coli* K88 in vitro. *Journal of Environmental Sciences*, 23(11): 1808-1815. doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60651-1

Hesta, M., S. Arnouts, and G. Janssens. 2008. Dietary supplementation of coated butyrate in healthy dogs: effect on apparent digestibility, faecal flora and faecal volatile fatty acids. *Veterinari Medicina*. 53(3): 147. doi: 10.17221/1941-VETMED

Houtman, T. A., Eckermann, H. A., Smidt, H., and de Weerth, C. 2022. Gut microbiota and BMI throughout childhood: The role of firmicutes, bacteroidetes, and short-chain fatty acid producers. *Scientific Reports*, 12(1):3140. doi.org/10.1038/s41598-022-07176-6

Inness, V. L., McCartney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L., and Gibson, G. R. 2007. Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 91(1-2): 48-53. doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00640.x

Laflamme, D. P. 1997. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline Pract.* 25:13–18. doi:

Ley, R.E.; Backhed, F.; Turnbaugh, P.; Lozupone, C.A.; Knight, R.D. and Gordon, J.I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102: 11070–11075. doi.org/10.1073/pnas.0504978102

Li Z., Zhou J., Liang H., Ye L., Lan L., Lu F., Wang Q., Lei T., Yang X., Cui ,P. and Huang J. 2022. Differences in Alpha Diversity of Gut Microbiota in Neurological Diseases. *Front. Neurosci.* 16:879318. doi: 10.3389/fnins.2022.879318

Lisenko, K. G. Valor nutricional de farinhas de insetos para cães e gatos. / Karen Guttenkunst Lisenko - 2017. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017. 127 p.

National Research Council (NRC). 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. 2nd ed. Washington (DC): National Academy Press.

Pilla, R., Suchodolski, J. S. 2020. The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Frontiers in veterinary science*, 6: 498. doi.org/10.3389/fvets.2019.00498

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

Sabbioni, A., C. Ferrario, C. Milani, L. Mancabelli, E. Riccardi, F. Di Ianni, V. Beretti, P. Superchi, and M. C. Ossiprandi. 2016. Modulation of the bifidobacterial communities of the dog microbiota by zeolite. *Front. in Microbiology*. 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01491

Santos, L.D. L. Alimento seco extrusado para cães com zeólita e *Yucca schidigera*: parâmetros fisiológicos e intestinais / Lucas Daniel Lopes Santos. - 2023. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023. 123 p.

Su, X. 2021. Elucidating the Beta-Diversity of the microbiome: from global alignment to local alignment. *Msystems*, 6(4): e00363-21. doi.org/10.1128/msystems.00363-21

Superchi, P., Saleri R., Ossiprandi M. C., Riccardi E., Passaglia E., Cavalli V., Beretti V. & Sabbioni A. (2016): Natural zeolite (chabazite/phillipsite) dietary supplementation influences faecal microbiota and oxidant status of working dogs, *Italian Journal of Animal Science*. doi: 10.1080/1828051X.2016.1261008

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. and Gordon, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122): 1027-1031. doi.org/10.1038/nature05414

Wang, J. K., Ye, J. A., & Liu, J. X. 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. *Tropical animal health and production*, 44: 697-706. doi.org/10.1007/s11250-011-9960-8

Wang, B., Ma, M. P., Diao, Q. Y., and Tu, Y. 2019. Saponin-induced shifts in the rumen microbiome and metabolome of young cattle. *Frontiers in microbiology*, 10:356. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00356

Xu, J., Becker, A. A., Luo, Y., Zhang, W., Ge, B., Leng, C., Wang, G., Ding, L., Wang, J., Fu, X., and Janssens, G. P. 2021. The fecal microbiota of dogs switching to a raw diet only partially converges to that of wolves. *Frontiers in Microbiology*, 12: 701439. doi.org/10.3389/fmicb.2021.701439

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

Zheng, Z., Lyu, W., Ren, Y., Li, X., Zhao, S., Yang, H., and Xiao, Y. 2021. Allobaculum involves in the modulation of intestinal ANGPTL4 expression in mice treated by high-fat diet. *Frontiers in Nutrition*, 8:690138. doi.org/10.3389/fnut.2021.690138