

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminos fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães

**Márcia de Oliveira Sampaio Gomes**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães

**Márcia de Oliveira Sampaio Gomes**

**Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

G633e Gomes, Márcia de Oliveira Sampaio  
Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminos fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães. /  
Márcia de Oliveira Sampaio Gomes. – – Jaboticabal, 2009  
xv, 79 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi  
Co-orientador: Ruben Pablo Schocken-Iturrino  
Banca examinadora: Aureo Evangelista Santana, Maria Beatriz Abreu Glória  
Bibliografia

1. Prebiótico. 2. Mananoligossacarídeo. 3. Citometria de Fluxo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.39:636.7/.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**



### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** EFEITO DA ADIÇÃO DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA SOBRE A DIGESTIBILIDADE, MICROBIOTA, ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E AMINAS FECAIS E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE CÃES

**AUTORA:** **MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES**

**ORIENTADOR:** **Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI**

**Co-Orientador(a):** **Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN- ITURRINO**

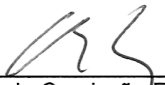
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA área de CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

  
Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

  
Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

  
Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA

Data da realização: 18 de fevereiro de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES** – Nascida em 28 de novembro de 1979, em Recife, estado de Pernambuco, filha de José Itamar Sampaio Gomes e Marly de Oliveira Sampaio Gomes, tornou-se graduada em Medicina Veterinária, em agosto de 2003, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – em Recife, PE. Coursou o Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária, na área de Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos, nos anos de 2004 a 2006, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP *Campus* de Jaboticabal, SP. Obteve a primeira colocação no processo seletivo do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, curso de mestrado, iniciando-o em março de 2007 sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

*"Agente espera do mundo e o mundo espera de nós."*

*Lenine*

A minha família por seu amor, apoio e  
paciência com a minha ausência.

*Dedico*

A Duda e Dirito, por seus exemplos  
de bondade, caridade e paciência  
que trarei comigo por todos os  
dias de minha existência.

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, como não poderia deixar de ser, a Deus por me dar à vida que tenho e me permitir ser a pessoa que sou hoje. Agradeço por me conceder a dádiva de tantos sonhos realizados e por me permitir mais esta conquista. Obrigada por estar sempre presente e, principalmente, me guiando através dos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Itamar e Marly, por todo o amor que me dão. Por todas as oportunidades que me propiciam. Pelo apoio. Pela base e princípios. Pelo exemplo. Não existem palavras suficientes para agradecer, mas tentarei sempre ser um motivo de orgulho pra vocês.

À Marcelo, meu irmão, meu amigo. De sua maneira sempre ao meu lado, dando apoio e zelando por mim.

À minhas tias Gleide e Glória, pelo incentivo e carinho sem medida em todos os aspectos da minha vida.

À todos meus primos e primas, em especial a Lali, Tércia, Edinho e André por serem tão especiais e presentes na minha vida.

Aos priminhos Bebel, Fran e Amanda por serem tão preciosos e importantes.

À minha família. A vocês cujo amor me dá forças pra seguir, que me acalma nos momentos de angústia, que me faz querer ser melhor e buscar o melhor. Sem vocês nada disso teria sentido. Nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Professor Aulus, com sua sabedoria e humildade, inspirou-me como profissional e se mostrou um exemplo de vida. Obrigada por ter acreditado em mim e me concedido tão valiosa oportunidade.

Ao Prof. Pablo, meu co-orientador, que sempre esteve disposto a ensinar, conduzir e mostrar caminhos. A sua amizade e confiança foram essenciais para que eu pudesse trilhar meu caminho com segurança.

À empresa Biorigin, nas pessoas de Fábio Goldflus e Rosangela Contieri, pelo auxílio financeiro e pelas importantes discussões técnicas durante o desenvolvimento do projeto.

À Mogiana Alimentos S/A, na pessoa de Rodrigo Bazolli, pela manutenção financeira do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

Agradeço a CAPES pelo auxílio concedido através da bolsa.



À Profa. Maria Beatriz, da UFMG, que nos abriu as portas de seu laboratório possibilitando a realização de análises fundamentais para cumprir com o nosso objetivo.

Ao Prof. Áureo, Unespiano sempre presente e pronto a dar sua inestimável colaboração. Obrigada pelas orientações e contribuições a minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Hélio, membro da banca do exame de qualificação, pelas suas sugestões e críticas essenciais a correção deste trabalho.

Aos funcionários que em diferentes oportunidades e de maneira distinta contribuíram para a realização deste projeto de pesquisa e o meu desenvolvimento profissional. Em especial, a querida Elaine, Johnes, Claudinha, Renata, Eugênio, Mateus, Marcão, Silvina e Edna, e a todos do Hospital Veterinário, aos quais sempre lembrarei com imenso carinho e gratidão.

À Flávia por sua amizade, paciência, boa vontade e disposição incansável em transmitir seus conhecimentos, me auxiliando de maneira única na condução deste projeto.

À Paulinha Xuxu, minha pessoa, que em pouco tempo conquistou minha amizade e admiração, tornando-se tão importante para mim quanto meus velhos amigos. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e pela ajuda na busca pelo conhecimento.

Aos amigos Anaeróbios, que engrandeceram minha vida, no aspecto profissional e pessoal. Em especial à queridíssima Mari, que sempre foi tão prestativa e atenciosa. As meigas Tammy, Dri e Gislaine, sempre pacientes e dispostas a ajudar. Ao Juliano, meu fiote, que proporcionou momentos memoráveis de descontração além de ajuda fundamental quando muito precisei. À Silvina, pela sua alegria e disposição em ajudar. À todos os que lá conheci, cuja companhia diária tornou a realização deste trabalho mais fácil e agradável.

Agradeço às minhas (ex)vizinhas e queridas Fefeu, Buneca, Pinga e Pati Coelho, pela companhia, amizade, confiança, paciência e longas conversas. Por tudo que dividimos e passamos saibam que sempre morarão em meu coração.

Aos membros e ex-membros da República Nutronco, em especial a Byna61, Sicrestoni, Gabis e Kellen pela amizade e grande momentos compartilhados.

À Luciene e Victor e sua crescente família, com quem compartilhei grandes momentos da minha vida, por terem sempre uma palavra consolo quando precisei. Obrigada por serem meus amigos de todas as horas.

À todos os estagiários e orientados de iniciação científica, que somaram muito a minha jornada e me estenderam a mão nos momentos de aperto. Meus queridos Sivi, Bruninha, Ana Paula, Pitanga,

Amanda, Mariana Uréia, Carol, Chayanne, Marina e Mayara, dentre tantos que passaram pelo laboratório, saibam que serei eternamente grata a todos vocês.

Aos animais, que são um motivo, inspiração e filosofia de vida. Em especial àqueles que me inspiram diariamente: Polly e Kuki, Dobby, Schumi e Vileneuve, e todos os cães e gatos do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

Aos amigos do colégio Salesiano, pois a distância não diminui o afeto e o carinho que nos unem. Obrigada Antinha, Chapa, Smurf e todos deste período tão inesquecível e feliz da minha vida.

Aos grandes amigos sem os quais minha vida não teria a mesma graça e brilho: meus irmãozinhos JP e Dudu, o menino Filli e minhas queridas Fabíola, Jordânia, Ellinha e Harder.

E como não poderia deixar de ser, aos meus colegas de trabalho. A todos da “Nutripeople” que fizeram destes anos de convivência uma experiência memorável e única. Agradeço a todos por terem cruzado meu caminho e terem deixado suas marcas, que sempre carregarei comigo por onde quer que eu vá. Agradeço por poder dizer que vocês fizeram, fazem e farão sempre parte de minha história.

A todos vocês que são mais que colegas de profissão são verdadeiros amigos: Marcinho, Teshima, Blé, Jujubis, Mayumi, RicVascon, Mari Florzinha, Luciana, Karina, Fabiano (e Jule), Zaine, Thailinha, Letícia, Michele e Guilherme. Muito obrigada!

Agradeço a todos, os aqui citados e os que por descuido não citei, pois me ensinaram muito mais do que podem imaginar, e porque fizeram desse período uma lição única e serão sempre um capítulo especial na minha vida.

*“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós.*

*Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

**Obrigada a todos. Por tudo.**

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| Lista de tabelas .....   | x      |
| Lista de figuras .....   | xii    |
| Lista de abreviaturas .....  | xiii   |
| Resumo .....   | xiv    |
| Summary .....  | xv     |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 01     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....   | 04     |
| 2.1. Microbiota do trato gastrointestinal dos cães e sua importância .....         | 04     |
| 2.2. Produtos da fermentação microbiana no intestino grosso de cães .....          | 08     |
| 2.3. Imunidade associada à mucosa .....  | 13     |
| 2.4. Prebiótico .....  | 15     |
| 2.5. Caracterização da parede celular de levedura .....                            | 21     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 26     |
| 3.1. Animais .....   | 26     |
| 3.2. Delineamento experimental .....   | 26     |
| 3.3. Dietas experimentais .....  | 27     |
| 3.4. Parâmetros avaliados .....  | 30     |
| 3.5. Análise estatística .....   | 44     |
| 4. RESULTADOS .....  | 45     |
| 4.1. Digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade fecal .....     | 45     |
| 4.2. Composição microbiológica das fezes .....                                     | 49     |
| 4.3. Concentração fecal dos ácidos graxos de cadeia curta e aminos bioativas ..... | 49     |
| 4.4. Hemograma e determinações bioquímicas .....                                   | 53     |
| 4.5. Imunofenotipagem de linfócitos .....  | 53     |
| 4.6. Determinação do proteinograma sérico .....                                    | 53     |
| 5. DISCUSSÃO .....   | 58     |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 68     |
| 7. REFERÊNCIAS .....   | 69     |

## LISTA DE TABELAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Tabela 01.</b> Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais .  | 27     |
| <b>Tabela 02.</b> Composição química do ActiveMOS® segundo o fabricante .....  | 28     |
| <b>Tabela 03.</b> Fórmula das dietas experimentais. Valores sobre a matéria original .....   | 29     |
| <b>Tabela 04.</b> Composição química analisada das dietas experimentais .....  | 29     |
| <b>Tabela 05.</b> Métodos empregados para cultura das bactérias em estudo .....  | 33     |
| <b>Tabela 06.</b> Características morfo-tinturiais dos gêneros de bactérias em estudo em esfregaços corados pelo método de Gram .....  | 34     |
| <b>Tabela 07.</b> Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo .....  | 40     |
| <b>Tabela 08.</b> Preparação das amostras de sangue para análise citométrica .....   | 41     |
| <b>Tabela 09.</b> Consumo de nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente das dietas experimentais com diferentes níveis de inclusões de parede celular de levedura para cães .....                       | 46     |
| <b>Tabela 10.</b> Valores da energia bruta, energia metabolizável e coeficientes de metabolização da energia bruta das dietas experimentais com diferentes inclusões de parede celular de levedura para cães. .... | 47     |
| <b>Tabela 11.</b> Variáveis fecais e urinárias em cães mediante o consumo das dietas experimentais com parede celular de levedura .....  | 48     |
| <b>Tabela 12.</b> Contagem de bactérias nas fezes de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura .....  | 50     |
| <b>Tabela 13.</b> Concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura .....  | 51     |
| <b>Tabela 14.</b> Concentração de aminas bioativas nas fezes de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura .....   | 52     |
| <b>Tabela 15.</b> Hemograma de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura. Parâmetros eritroleucométricos e plaquetários em valores absolutos .....                    | 54     |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Tabela 16.</b> | Atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e concentrações séricas de uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura ..... | 55 |
| <b>Tabela 17.</b> | Subpopulações linfocitárias no sangue de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura .....   | 56 |
| <b>Tabela 18.</b> | Concentrações séricas de proteínas totais e suas frações albumina, $\alpha_1$ -globulina; $\alpha_2$ -globulina; $\beta$ -globulina e $\gamma$ -globulina de cães mediante consumo das dietas experimentais com parede celular de levedura .....                                    | 57 |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 01.</b> Figura esquemática apresentando a composição e estrutura da parede celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 24     |
| <b>Figura 02.</b> Representação gráfica da distribuição das populações leucocitárias observadas na citometria de fluxo, de acordo com a complexidade e o tamanho das células, com <i>gate</i> sobre a população de linfócitos .....    | 42     |
| <b>Figura 03.</b> Representação gráfica da distribuição das células de acordo com a complexidade interna da célula (" <i>Side Scatter</i> – SSC"), com <i>gate</i> (P2) sobre as subpopulações linfocitárias CD5+ (A) e CD45+(B) ..... | 42     |
| <b>Figura 04.</b> Representação gráfica das subpopulações linfocitárias ( <i>gate</i> - P3) CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (A), CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (B) e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> (C) .....               | 43     |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|       |   |
|-------|---|
| AAFCO | Association of American Feed Control Official           |
| AGCC  | Ácidos graxos de cadeia curta                           |
| ALT   | Alanina aminotransferase                                |
| CD    | <i>Cluster designation</i> ou designação de agrupamento |
| CDA   | Coeficiente de digestibilidade aparente                 |
| CMEB  | Coeficiente de metabolização da energia bruta           |
| CV    | Coeficiente de variação                                 |
| EB    | Energia bruta   |
| EDTA  | Ácido etilenodiaminotetracético                         |
| EEA   | Extrato etéreo em hidrólise ácida                       |
| EM    | Energia metabolizável                                   |
| ENN   | Extrato não-nitrogenado                                 |
| EPM   | Erro padrão da média                                    |
| FA    | Fosfatase alcalina                                      |
| FB    | Fibra bruta   |
| FCAV  | Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias           |
| FOS   | Frutoligossacarídeo                                     |
| IG    | Intestino grosso  |
| MM    | Matéria mineral   |
| MN    | Matéria natural   |
| MO    | Matéria orgânica  |
| MOS   | Mananoligossacarídeo                                    |
| MS    | Matéria seca  |
| NRC   | National Research Council                               |
| OND   | Oligossacarídeo não digestível                          |
| PB    | Proteína bruta  |
| PCL   | Parede celular de levedura                              |
| TGI   | Trato gastrintestinal                                   |
| UFC   | Unidades formadoras de colônia                          |
| Unesp | Universidade Estadual Paulista                          |

## **EFEITO DA ADIÇÃO DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA SOBRE A DIGESTIBILIDADE, MICROBIOTA, ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA E AMINAS FECAIS E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DE CÃES**

**RESUMO** - Considerando a importância da eubiota intestinal na saúde dos animais, o papel da dieta em sua composição e metabolismo tem sido estudado. Neste aspecto os prebióticos têm merecido destaque, incluindo-se a parede celular de leveduras (PCL), uma fonte natural de mananoligossacarídeos. Para o estudo de seu potencial prebiótico para cães, foram empregadas quatro dietas isonutrientes com inclusão de 0% (T0), 0,15% (T15), 0,30% (T30) e 0,45% (T45) de PCL. Foram utilizados oito Beagles adultos, divididos em dois quadrados latinos 4 X 4. Em cada período uma fase de adaptação de 15 dias precedeu 5 dias de coleta total de fezes para o ensaio de digestibilidade e 1 dia de coleta de fezes frescas para enumeração bacteriana, mensuração de pH e determinação das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta e aminos bioativas. No dia 21 de cada período, amostra de sangue foi colhida para quantificação imunofenotípica por citometria de fluxo das subpopulações linfocitárias  $CD5^+CD4^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD5^+CD8^+$ ,  $CD45^+$  e  $CD45^+CD21^+$ . Os dados foram avaliados pelo Proc GLM do SAS, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey e por contraste polinomial e ortogonal ( $p < 0,1$ ). Os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes não variaram com a inclusão de PCL ( $p > 0,1$ ). A inclusão de PCL não resultou em diferenças quanto às contagens de anaeróbios totais, aeróbios totais, bifidobactéria, lactobacilos, clostrídios nas fezes dos cães ( $p > 0,1$ ). Verificou-se aumento linear na concentração fecal de butirato ( $p = 0,055$ ), redução linear das concentrações fecais de tiramina ( $P = 0,1$ ) e histamina ( $P = 0,07$ ) e redução quadrática de feniletilamina e triptamina ( $P = 0,07$ ). Os cães apresentaram, também, aumento linear na concentração de linfócitos  $CD5^+$  ( $P = 0,10$ ) e maior número de linfócitos  $CD45^+CD21^+$  ( $P = 0,053$ ) mediante ingestão de PCL. Concluiu-se que a PCL apresenta efeito prebiótico, pela mudança na atividade metabólica da microbiota intestinal e imunoestimulante para cães.

**PALAVRAS-CHAVE:** prebiótico, mananoligossacarídeo, citometria de fluxo.



## EFFECTS OF YEAST CELL WALL ADDTION ON DIET DIGESTIBILITY, FECAL BACTERIAL ENUMERATION, SHORT-CHAIN FATTY ACID AND AMINE CONCENTRATION AND HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF DOGS

**SUMMARY** – Considering the importance of the intestinal microbiota to the animal health, the role of diet upon microbiota composition and metabolism have been studied. Prebiotics have been emphasized on this regard, including the yeasts cell walls (YCW), a natural source of mannanoligosaccharides. To study the prebiotic potential of this compound for dogs, four isonutrient diets were used with inclusion of 0% (T0), 0,15% (T15), 0,30% (T30) and 0,45% (T45) of YCW. Eight Beagles adults were used, arranged in two 4 X 4 Latin squares. In each replicate an adaptation phase of 15 days preceded a 5 days of total feces collection for digestibility trial and 1 day collection of fresh fecal samples for bacterial enumeration, pH measurement and determination of short chain fatty-acids and bioactive amines concentration. On day 21, a blood samples were collected for immunophenotypic quantification of lymphocyte subsets CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> through flow cytometry. The data were evaluated using Proc GLM of SAS, means were compared by Tukey test and polinomial and orthogonal contrasts ( $p < 0,1$ ). The inclusion of YCW did not change the coefficient of total tract apparent digestibility of nutrients ( $p > 0.1$ ) nor the fecal bacterial enumeration (total aerobes and anaerobes, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and *Escherichia coli*) in dog's feces ( $p > 0.1$ ). Fecal butirate concentration increased linearly with YCW addition ( $p = 0,055$ ), fecal concentrations of tyramine ( $P = 0,1$ ) and histamine ( $P = 0,07$ ) decreased linearly, and phenylethylamine ( $P = 0,07$ ) and tryptamine ( $P = 0,07$ ) concentrations showed a quadratic reduction with YCW consumption. Dogs also presented a linear increase in lymphocytes CD5<sup>+</sup> concentration ( $P = 0,10$ ) and a greater CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> lymphocytes number ( $P = 0,053$ ) with YCW addition. In conclusion YCW presents a prebiotic (changing bacterial end product formation) and immunostimulating effect for dogs.

**KEYWORDS:** prebiotic, mannanoligosaccharide, flow cytometry.

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de *pet food* mudou consideravelmente nas últimas décadas, especialmente a partir de 1994 com o advento do Plano Real e da conseqüente estabilização de preços. Verificou-se aumento significativo na população de cães e gatos domésticos, mudança na maneira como são alimentados e no comportamento dos seus proprietários com relação à compra dos seus alimentos. Aumentaram também os cuidados com higiene, tratamento e prevenção de doenças, a preocupação com longevidade e qualidade de vida dos animais. Esse novo padrão de comportamento levou os proprietários de animais domésticos a buscarem informações, produtos e serviços que aumentassem a expectativa de vida, ampliassem o bem-estar e recompensassem o companheirismo dos seus animais de estimação (BERNASCONI & ALCÂNTARA, 2007).

Cada vez mais cães e gatos ocupam papéis importantes na sociedade. Calcula-se que existam cerca de 800 milhões de cães e gatos em todo o mundo sendo criados como “membros da família”. É um fenômeno mundial que está ligado ao aumento da expectativa de vida da sociedade moderna, maior número de idosos, redução do número de filhos, falta de segurança e, especialmente, por maior carência afetiva (RUSSO, 2005). Da mesma forma, a maior conscientização da população com relação aos benefícios da alimentação industrializada para cães e gatos, incluindo melhor custo/benefício e maior segurança de saúde do animal de estimação, tem levado ao aumento do uso de *pet food* no Brasil nos últimos anos (HÁFEZ, 2002). Dentro deste contexto, o amadurecimento e “humanização” verificados no mercado *pet* têm contribuído para maior utilização de produtos de melhor qualidade, estimulando o desenvolvimento e produção dos alimentos com maior valor agregado (AMBROZINI, 2007).

Os avanços na nutrição de animais de companhia freqüentemente seguem aqueles que são verificados na nutrição humana. Os conceitos de nutrição estão se expandindo para além da fronteira da sobrevivência e satisfação da fome para enfatizar a utilização de alimentos que promovam bem estar e melhora na saúde, além de reduzir

risco de doenças (FAHEY, 2003). Mais recentemente, o foco tem sido direcionado para obtenção de uma dieta balanceada que maximize a expectativa e a qualidade de vida pela utilização de ingredientes que desenvolvam a capacidade de resistir a doenças e melhorar a saúde (TZORTZIS et al., 2003), alimentos estes comumente referidos como “funcionais”.

Por definição alimentos funcionais são aqueles que, em virtude de incluírem componentes fisiologicamente ativos, provêem benefícios adicionais aos da nutrição básica e podem reduzir os riscos de doenças ou promover saúde (ROBERFROID, 2002). Dentre as pesquisas mais promissoras nesta área estão os alimentos que promovem saúde do trato gastrointestinal, possuem efeitos antioxidantes e atuam sobre o metabolismo de macronutrientes (FAHEY, 2003).

Em animais monogástricos, incluindo humanos, o intestino grosso (IG) possui papel importante na absorção e secreção da água e eletrólitos. Além disso, sabe-se que o IG também compreende um importante ecossistema de microorganismos que influencia tanto a saúde como a doença no animal hospedeiro (ADAMS, 2003). As bactérias que conseguem mais rapidamente degradar e utilizar a digesta irão proliferar-se mais intensamente, sobressaindo-se às outras (CUMMINGS & MACFARLANE, 1991).

Muitos ingredientes já foram propostos como provedores de benefícios por alterarem um ou mais processos fisiológicos no IG e, com estudos contínuos, provavelmente muitos outros ainda surgirão (FAHEY, 2003).

Carboidratos que são indigeríveis por enzimas de mamíferos estão entre os compostos que podem influenciar a composição e atividade metabólica da microbiota intestinal sendo, portanto, de interesse para a formulação de *pet food* e alimentos veterinários específicos (ZENTEK et al., 2002).

Dentre tais carboidratos, os mananoligossacarídeos (MOS), compostos naturalmente presentes na parede celular de leveduras (PCL), parecem ser fermentados no intestino de cães (VICKERS et al., 2001) e podem aumentar o número de lactobacilos fecais (SWANSON et al., 2002) e de bifidobactérias (GRIESHOP et al., 2004) e tendo por essas razões, possível efeito prebiótico. Porém, até hoje, poucos

dados estão disponíveis sobre as características de mananoligossacarídeos para que estes sejam classificados como prebióticos para cães (MIDDELBOSS et al., 2007). Além disso, acredita-se que os MOS apresentem a capacidade de modular o sistema imunológico e a microbiota intestinal e preservar a integridade da superfície de absorção intestinal, ao bloquear a aderência das bactérias patogênicas às células epiteliais da mucosa do intestino.

Desta forma, o efeito potencial do MOS sobre o sistema imune e eubiota intestinal, combinados à sua elevada concentração na PCL seca, podem fazer destes produtos importantes ingredientes funcionais para *pet food*.

Segundo FAHEY (2003), apesar dos recentes avanços no estudo da nutrição dos animais de estimação, ainda são necessárias pesquisas na área de caracterização físico-química dos ingredientes utilizados pela indústria, de forma a aperfeiçoar a utilização destes nas formulações. Neste contexto poucos experimentos avaliaram o efeito de leveduras e seus subprodutos sobre a saúde de cães, e nenhum foi realizado com felinos (SWANSON & FAHEY, 2006). Os resultados dos estudos para cães são controversos, possivelmente como consequência de variações nas dosagens administradas, efeito da dieta e sua formulação sobre a ação prebiótica da PCL, entre outros. Mesmo a dose ideal de PCL em *pet food* atualmente é desconhecida, embora se conheça que níveis altos de suplementação (5% da dieta) reduzam a digestibilidade dos nutrientes (MIDDELBOSS et al., 2007).

Diante do exposto, concebeu-se este ensaio com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes inclusões dietéticas de parede celular de levedura seca sobre os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, composição da microbiota fecal, produtos finais da fermentação microbiana e variáveis hematológicas e imunológicas em cães adultos hígidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Microbiota do trato gastrintestinal dos cães e sua importância

Diferentemente de outros monogástricos e humanos, a pesquisa sobre a microbiota intestinal de cães e gatos tem sido limitada. Recentemente, entretanto, esforços foram dedicados ao maior entendimento da ecologia microbiana do cólon de cães e gatos. Estas pesquisas sugerem a presença de uma complexa e diversificada população de microrganismos, com um grande número de bactérias anaeróbias, que promovem significativa fermentação no cólon destes animais. Estudos recentes demonstram aumento significativo na concentração fecal de patógenos, ou de espécies bacterianas indesejáveis com o avançar da idade de animais de companhia (HUSSEIN et al., 1999; HUSSEIN & SUNVOLD, 2000).

Logo após o nascimento, as superfícies mucosas dos animais, que, em condições fetais são estéreis, rapidamente são colonizadas por diversos microrganismos, tornando-se um ecossistema de alta complexidade com cerca de 100 trilhões de bactérias pertencentes a mais de 400 espécies diferentes. Em mamíferos, incluindo as espécies de animais de companhia, a colonização da mucosa intestinal se inicia com o fornecimento do colostro e leite materno. As primeiras experiências dietéticas, a exposição a microrganismos e a exploração do ambiente por estes animais contribuem para a formação e estabelecimento da microbiota intestinal. A nutrição subsequente, para o resto de sua vida, ditará as mudanças na composição desta microbiota, incluindo o estabelecimento ou prevenção de distúrbios digestivos. A utilização de ingredientes alimentares como fontes de fibras (prebióticos), enzimas, probióticos (culturas bacterianas) e acidificantes na formulação podem influenciar o perfil da microbiota residente, resultando em benefícios para o animal (WENK, 2006).

O intestino delgado dos cães possui uma população microbiana simples, no duodeno e jejuno encontram-se, predominantemente, *Streptococcus* e *Lactobacillus* e, no íleo, *Escherichia coli* e bactérias anaeróbias. A baixa densidade de microrganismos

é resultado, principalmente, da influência da acidez gástrica e da bile (NRC, 2006) que proporcionam um ambiente desfavorável à proliferação dos microrganismos.

A principal função do intestino grosso (IG) de cães e gatos é a absorção de eletrólitos e água, além de propiciar um ambiente para fermentação microbiana dos nutrientes que escaparam da digestão e absorção no intestino delgado. A microbiota do IG dos cães apresenta uma população heterogênea e complexa, bastante dinâmica, constituída por inúmeras espécies bacterianas. Estas sofrem ação de uma série de fatores, incluindo a dieta, pH, temperatura e peristaltismo. PATTERSON & BURKHOLDER (2003) descreveram que espécies de lactobacilos e bifidobactérias são sensíveis ao estresse do hospedeiro, já que estas populações tendem a diminuir em aves nestas condições.

Segundo VANHOUTTE et al. (2005), a densidade das bactérias presentes no IG pode alcançar  $10^{10}$  por grama de fezes, sendo composta principalmente por estreptococos, bifidobactérias, lactobacilos, *Bacterioides* e *Clostridium*.

Os microrganismos presentes no trato gastrointestinal mantêm relações simbióticas ou antagônicas, nutrindo-se dos componentes de alimentos não digeridos e das secreções do trato gastrointestinal (TESHIMA, 2003). Podem encontrar-se tanto associadas intimamente com o epitélio, como livres na luz intestinal (FURLAN, 2004). Em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio. No entanto, em condições de estresse (doença, antibioticoterapia, mudança da dieta, alterações climáticas ou qualquer outra situação desfavorável) as populações comensais tendem a diminuir e as nocivas a se proliferar. Este desequilíbrio é chamado de *disbiose*, e se reflete negativamente sobre a saúde e o desempenho animal (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

Existem fortes evidências de que a dieta possua influência sobre a composição da microbiota do cólon. HUSSEIN et al. (1999) descreveram, por exemplo, que a fonte e a quantidade de proteína dietética influencia a maior ocorrência de patógenos, como os *Clostridia* tende a ocasionar diminuição da concentração fecal de bifidobacterias. Nestas circunstâncias, a consistência fecal piora e a excreção de enterotoxinas do

*Clostridium perfringens* e outros produtos metabólicos relacionados à decomposição bacteriana de proteínas aumenta (ZENTEK et al., 2003).

Acredita-se que a microbiota benéfica possa auxiliar a digestão e absorção de nutrientes, produza vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminua, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (SILVA & NÖRNBORG, 2003). Dentre estes gêneros de bactérias comensais *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* talvez sejam os que mais têm sido considerados e estudados.

As bactérias nocivas, por outro lado, podem causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades, como é o caso da *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Salmonella*.

Estudos indicam também que a microbiota do cólon não apenas contribui para o seu funcionamento normal como também participam significativamente no desencadeamento ou prevenção de várias doenças pela biotransformação de diversos compostos da ingesta, ou mesmo endógenos, em derivados benéficos ou prejudiciais (HUSSEIN et al., 1999). Assim, a flora eutrófica, ou microbiota nativa produz ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e ácido láctico. Esses ácidos orgânicos diminuem o pH fecal, favorecendo a inibição das bactérias patogênicas e estimulando a proliferação de enterócitos. Com isto pode ocorrer melhoria da estrutura e integridade da parede celular, favorecendo a capacidade de absorção intestinal de nutrientes.

O contrário ocorre em situação de *disbiose*, quando o aumento da população microbiana indesejável pode levar à diminuição da absorção de nutrientes, aumento da espessura da mucosa e da velocidade de passagem da digesta, além de aumentar a produção de aminas biogênicas (cadaverina, histamina, putrescina, etc), amônia e gases, que são altamente prejudiciais à integridade da mucosa e à saúde intestinal (FLEMMING, 2005).

A maturação dos enterócitos ocorre durante o processo de migração da cripta para a ponta do vilão. Este é dependente de estímulos para a sua diferenciação. O número e tamanho dos vilões dependem do número de células que os compõem. Assim, quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilão e, por consequência, maior

a área de absorção de nutrientes. Dessa forma, a absorção somente se otimizará quando houver integridade funcional das células dos vilos. Outro fator relevante para a absorção dos nutrientes é a quantidade de microvilos existentes nos enterócitos. O número de microvilos atua como um amplificador de área para a absorção dos nutrientes (FURLAN, 2004).

Ainda nas situações de *disbiose*, há interferência nas necessidades nutricionais do hospedeiro pelo aumento da velocidade de renovação dos enterócitos e diminuição da altura dos vilos. Estes fatores determinam aumento na profundidade das criptas e espessura da mucosa intestinal, aumento na velocidade de passagem da digesta e, por conseguinte, diminuição da absorção dos nutrientes. Além disso, a população microbiana indesejável compete com o hospedeiro por nutrientes presentes na luz intestinal, resultantes do processo digestivo (FURLAN, 2004; FLEMMING, 2005). Dessa forma a manutenção do status de *eubiose*, ou seja, o estabelecimento de uma microbiota estável e benéfica ao trato digestivo é fator chave na preservação da saúde do animal (WENK, 2006).

Verifica-se, assim, que a adição de carboidratos fermentáveis à dieta de animais de companhia é importante para que haja um adequado suprimento de matéria orgânica para o intestino grosso, sem o que podem ocorrer efeitos negativos na digestão pós-ileal resultante de alterações na microbiota da luz deste órgão (CARCIOFI, 2005; NRC, 2006). Esta medida aumenta a função de barreira da mucosa intestinal e diminui o risco de translocação bacteriana e septicemia, demonstrando serem componentes importantes das dietas de cães e gatos. Ao se formular alimentos para estas espécies é necessário considerar que o alimento deve prover nutrientes para o indivíduo tanto quanto para as bactérias residentes no TGI (BUDDINGTON & SUNVOLD, 2000)



## 2.2. Produtos da fermentação microbiana no intestino grosso de cães

Em diferentes regiões do TGI estão presentes grupos específicos de microrganismos capazes de produzir grande diversidade de compostos com variados efeitos tanto na fisiologia intestinal quanto sistêmica. Estes também produzem enzimas capazes de atuar metabolicamente no intestino, na catalização de substâncias em compostos que podem ser benéficos ou nocivos ao hospedeiro. Tais compostos podem afetar a nutrição, a fisiologia, a eficácia de fármacos, a carcinogênese e o processo de envelhecimento, assim como a resistência do hospedeiro à infecção (TESHIMA, 2003).

A capacidade metabólica das bactérias intestinais é extremamente diversa. Qualquer composto ingerido ou qualquer substância que adentra a luz intestinal por intermédio do trato biliar, sangue ou diretamente por secreção no lúmen é um substrato em potencial para a fermentação ou transformação bacteriana (TESHIMA, 2003). Embora não se conheça bem a atividade enzimática na maioria dos grupos bacterianos intestinais, acredita-se que a degradação de materiais altamente polimerizados seja neste órgão uma atividade cooperativa, com a participação de vários grupos bacterianos. Os principais gêneros envolvidos na degradação dos poli e oligossacarídeos são os *Bacterioides* e *Bifidobacterium*.

O grande número de bactérias presentes ( $10^{10}$  por grama de fezes na matéria seca) contribui significativamente para a fermentação, no cólon, de carboidratos complexos e proteínas levando a produção dos ácidos graxos de cadeia curta, considerados benéficos, e vários componentes putrefativos, considerados tóxicos (aminas biogênicas, amônia, indol e fenol), sendo necessário considerar que existem diversas espécies bacterianas no intestino grosso, mas a função que elas exercem é distinta. A proporção relativa em que os supracitados compostos são produzidos está diretamente relacionada com o balanço de bactérias e de substratos disponíveis no cólon (ADAM, 2003).

Talvez os principais substratos para a microbiota presente no IG incluam os próprios componentes dietéticos que não foram digeridos ou absorvidos no intestino delgado. Uma vez que alcançam o IG, a maioria dos oligossacarídeos não digestíveis

são hidrolisados a monossacarídeos e, posteriormente, metabolizados por bactérias anaeróbicas presentes no IG em um processo fermentativo. Este processo fornece energia para a proliferação das bactérias e gera gases e muitas outras moléculas menores (Quadro 1), que possuem inúmeros efeitos sobre o hospedeiro (ADAM, 2003).

**Quadro 1.** Produtos gerados na fermentação de substratos no intestino grosso

|                  |                                    |                    |
|------------------|------------------------------------|--------------------|
| Ácido acético    | Ácido pirúvico                     | Indol e escatol    |
| Ácido butírico   | Etanol                             | Hidrogênio         |
| Ácido propiônico | Ácidos graxos de cadeia ramificada | Metano             |
| Ácido láctico    | Aminas                             | Dióxido de carbono |
| Ácido succínico  | Fenóis e cresóis                   | Amônia             |

Fonte: ADAM (2003).

Muitos ácidos orgânicos são produzidos, por exemplo, ácidos acético, propiônico e butírico, freqüentemente descritos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O ácido acético e propiônico são prontamente absorvidos e entram na corrente sanguínea, sendo fonte de energia extra para o hospedeiro. O ácido butírico é a principal fonte de energia para os colonócitos, sendo um importante regulador do crescimento e diferenciação celular (NRC, 2006). Os ácidos láctico, succínico e pirúvico e o etanol são usualmente metabolizados a AGCC. Ácidos orgânicos de maneira geral têm atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias Gram negativas como *E. coli* e espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* (ADAM, 2003).

Entre os AGCC, o butirato se destaca por sua contribuição para a manutenção da integridade do cólon. Parece haver uma preferência dos colonócitos para o metabolismo de butirato, que contribui diretamente como fonte de energia para estas células, podendo representar até 70% de seu consumo energético (SWANSON & FAHEY, 2007). O suprimento de butirato ajuda a manter a integridade da mucosa, desempenhando importante papel na manutenção de um fenótipo celular normal e redução do risco de carcinomas colônicos (NRC, 2006). Outras funções dos ácidos graxos incluem: alteração do fluxo sanguíneo e da atividade muscular no cólon,

estimulação da produção de mucina e proliferação de enterócitos. Assim, embora os produtos da fermentação intestinal de proteínas sejam geralmente considerados tóxicos à saúde humana e animal, os produtos da fermentação de carboidratos, os AGCC, podem contribuir positivamente na digestão e metabolismo do hospedeiro, além de poder atenuar os efeitos negativos dos produtos gerados pela degradação das proteínas (TELLEZ et al., 2006).

A maior parte dos AGCC são absorvidos como ácidos não dissociados através da membrana luminal por difusão passiva, processo que envolve troca de íons de sódio e hidrogênio pela membrana (HUME, 1997). Sendo assim, os AGCC estimulam a absorção de água e eletrólitos, estando envolvidos na função osmorregulatória do intestino. Como possuem característica aniônica estes ácidos aumentam a taxa de absorção de sódio e, a combinação da absorção de AGCC e sódio no intestino grosso acarretam uma maior absorção de água. As propriedades osmótica e reabsortiva dos AGCC parecem ser dose-dependente, pois em concentrações extremamente baixas ou altas ocorre aumento no conteúdo de água fecal. No entanto, moderadas concentrações de AGCC, em geral, diminuem o conteúdo fecal de água (KAWAUCHI, 2008).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os produtos intermediários e finais da fermentação realizada pela microbiota intestinal dependem da composição química do carboidrato. Assim, a fermentação do amido produz elevada quantidade de butirato, enquanto um substrato mais oxidado como a pectina produz maior quantidade de acetato. Outros fatores que podem contribuir para a utilização de polissacarídeos pela microbiota incluem a solubilidade do polissacarídeo em água, o tipo de processo ao qual o alimento é submetido e o tamanho da partícula que chega ao intestino (TESHIMA, 2003).

Gases não têm valor para o hospedeiro e são em sua maioria liberados do organismo através da respiração ou flatos. A produção de amônia pode ser importante, especialmente para animais de produção que são criados confinados, quando esta passa a ser um poluente ambiental, sendo necessário regimes alimentares que reduzam a produção de amônia tanto quanto possível (ADAM, 2003).

Indóis e fenóis são produtos da quebra dos aminoácido aromáticos no IG. O indol é originado do triptofano enquanto o fenol é produzido a partir da tirosina. Fenol tem sido incriminado como promotor do câncer de pele e como exarcebador da colite ulcerativa. Fenóis são principalmente excretados pela urina após sofrerem conjugações com sulfato, glutathione e ácido glicurônico, na mucosa do IG ou no fígado (PEIXE et al., 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre o metabolismo do fenol no cólon (SWANSON & FAHEY, 2007). Outros compostos como cresóis, indol e escatol também são produzidos e todos são potencialmente tóxicos para os animais e podem desencadear condições patológicas. São considerados como possíveis carcinogênicos e também contribuem para a poluição do ar em ambientes fechados (ADAM, 2003).

Aminas são formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos pelos microrganismos do TGI. Podem ser formadas também por transaminação de aldeídos ou cetonas e hidrólise de compostos nitrogenados (HUSSEIN et al., 1999). As aminas bioativas são substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular sintetizadas durante o processo metabólico em todos os organismos vivos, possuindo funções relevantes nos tecidos vegetais e animais. Estas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina, da estrutura química, da via biossintética e ainda quanto ao grau de substituição do hidrogênio da amônia (ROSSATO, 2005).

Quanto ao número de grupamento amina na molécula, podem ser classificadas em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina). Quanto a estrutura química as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina). Ainda com relação à estrutura química, podem ser classificadas de acordo com o grupo químico que apresentam em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolininas (histamina). Quanto ao grau de substituição do hidrogênio, existem as aminas primárias, secundárias e terciárias, em que, respectivamente, ocorre substituição de um, dois ou três hidrogênios (ROSSATO, 2005).

Quanto à via biossintética, as aminas classificam-se em naturais e biogênicas. As biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas. Como exemplo deste grupo, podem ser citadas histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina. Também podem ser formadas por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados ou decomposição térmica. Segundo SHALABY (1996), estas são designadas como biogênicas porque são formadas por ação de organismos vivos. As aminas naturais putrescina, agmatina, espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas e a histamina está armazenada nos mastócitos e basófilos. Interessante observar que a histamina poderia se encaixar nestes dois grupos (ROSSATO, 2005).

As poliaminas espermina e espermidina são indispensáveis às células por estarem diretamente relacionadas ao crescimento, renovação e metabolismo celular. São necessárias para o crescimento, manutenção da saúde e bom funcionamento do organismo. Estas são também importantes para filhotes, principalmente durante o desmame precoce devido a sua participação no crescimento e maturação do TGI (GLÓRIA, 2006).

As aminas biogênicas podem ser vasoativas ou neuroativas. A presença destas aminas na dieta em quantidades adequadas é importante para a saúde do animal, mas apesar de necessárias em alguns processos bioquímicos, podem causar efeitos tóxicos quando em altas concentrações (GLÓRIA, 2006).

Sendo assim, apesar das evidências dos efeitos indesejáveis das aminas, poliaminas estimulam a síntese de DNA, RNA e protéica e são importantes para a maturação da mucosa intestinal. Devido a sua rápida absorção no intestino delgado, a produção microbiana de poliaminas é provavelmente de grande importância para o fornecimento desses compostos a mucosa do IG (MORRISON & MACKIE, 1997; SWANSON & FAHEY, 2007). Não foram encontrados dados na literatura sobre os efeitos destas substâncias no crescimento e saúde de cães. Além disto, não foram encontrados dados sobre o perfil e teores destas substâncias em rações para estes animais.

A importância da determinação do perfil e do teor de amins em alimentos está ligada ao fato destas substâncias serem importantes indicadoras de processos tóxicos fermentativos. As amins biogênicas podem causar desnaturação ou efeitos tóxicos quando consumidas em grande quantidade. Um exemplo destes efeitos, observado em humanos, é enxaqueca e crise hipertensiva. A intoxicação alimentar causada por ingestão de histamina provoca efeitos cutâneos, gastrintestinais, hemodinâmicos e neurológicos. Outras amins, como putrescina, espermina, espermidina podem acelerar o desenvolvimento de tumores, devendo pacientes que estejam sob tratamento de câncer ter sua ingestão limitada (AVELAR et al., 2005). Em compostos não fermentáveis, a presença de amins biogênicas em alta quantidade é considerado um indicativo de atividade de bactérias indesejáveis.

### **2.3. Imunidade associada à mucosa**

O sistema imunológico compreende os componentes celular e humoral da resposta imune. É importante que os dois componentes funcionem de forma apropriada para proteger o organismo contra ação de agentes patogênicos (TIZARD, 2002). As superfícies mucosas dos tratos respiratório, gastrintestinal e urogenital, conjuntamente com a pele, têm a função primordial de separar o ambiente externo do interno dos organismos, o qual normalmente é isento de microrganismos, constituindo-se, assim, na primeira linha de defesa contra invasões por agentes infecciosos (GRIESHOP, 2002; MONTASSIER, 2004). Essas superfícies mucosas também desenvolvem mecanismos ativos de defesa, mediados por células e por fatores químicos, tanto relacionados à imunidade inata (não específica) como à adquirida (específica). Estes sistemas apresentam diferenças, ainda que não pronunciadas, devido a diferentes pressões externas a que são submetidos (SILVA, 2006).

São muitas as funções de proteção do TGI que auxiliam na prevenção contra a invasão de patógenos e ação de toxinas. Estas funções complexas são desempenhadas tanto por meios físicos como imunológicos (Quadro 2). O TGI possui

quatro mecanismos de defesa principais: barreira física, digestiva, tecido linfóide associado ao intestino (GALT - *gut-associated lymphoid tissues*) e a microbiota autóctone. A digestão pode auxiliar na eliminação de patógenos em potencial devido a acidez do estômago, que destrói muitos organismos, e há eliminação de microrganismos pelas enzimas digestivas do estômago e intestinos. O GALT é o maior órgão imunológico do organismo, possuindo aproximadamente 80% das células de defesa do corpo e mais de 50% das células imune efectoras (SWANSON & FAHEY, 2007).

**Quadro 2.** Principais mecanismos de defesa do trato gastrointestinal

| <b>Mecanismos não imunológicos</b>                                 | <b>Mecanismos imunológicos</b>   |
|--|--|
| Barreira gástrica  | Anticorpos naturais  |
| Substâncias antibacterianas: lisosima, secreções e ácidos biliares | IgA secretora  |
| Movimentos peristálticos intestinais                               | IgG, IgM e IgE   |
| Microbiota normal  | Imunidade celular (T <sub>CD4</sub> <sup>+</sup> , T <sub>CD8</sub> <sup>+</sup> ) |
| Filtração hepática   |  |

**Fonte:** RAMOS et al. (1985).

O desenvolvimento do GALT é altamente dependente da colonização bacteriana do intestino. Isso pôde ser demonstrado por estudos com animais gnotobióticos (germe-free). Estes apresentam morfologia intestinal anormal e sistema imune local subdesenvolvido, incluindo diminuição no número total de linfócitos intestinais, perfil de anticorpos alterado e placas de Peyer subdesenvolvidas (SWANSON & FAHEY, 2007).

O GALT é compreendido por células que residem na região da lâmina própria do intestino, entre as células epiteliais (linfócitos intraepiteliais) e por tecido linfático organizado (placas de Peyer e linfonodos mesentéricos). O sistema imune da mucosa é especializado em produzir grandes quantidades de imunoglobulina A (IgA). Esta é a única classe de anticorpos que é eficientemente secretada através das células epiteliais para o lúmen do TGI (GRIESHOP, 2002).

O GALT é composto por uma área aferente, onde são selecionados os antígenos dietéticos e microrganismos patogênicos e por uma área eferente, através da qual a imunidade celular e humoral respondem ao estímulo antigênico, ou seja, onde a resposta imune é efetuada. A ação de drogas quimioterápicas e doenças imunossupressoras prejudicam as atividades eferentes e aferentes da mucosa, afetando diretamente a habilidade do hospedeiro em controlar patógenos entéricos (SMITH et al. 1991).

A função primordial do sistema imune associado às mucosas é realizar a defesa do organismo hospedeiro contra diferentes tipos de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários. Assim, o sistema imune associado executa as seguintes atividades: 1) captura, processamento e apresentação de antígenos que tiverem sido ingeridos; 2) produção de anticorpos locais, em especial da classe IgA; 3) ativação de respostas imunes cito-mediadas, particularmente aquelas mediadas por células T citotóxicas CD8+, ou de células NK (natural killer cells) e por macrófagos (SILVA, 2006).

A partir do estímulo imunológico da mucosa ocorre produção de anticorpos tipo IgA, principalmente nas placas de Peyer, que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (SILVA, 2000). A produção constante de IgA, secretada em grandes quantidades na superfície da mucosa intestinal, ocorre devido a contínua estimulação proporcionada pela microflora normal do intestino.

## **2.4. Prebiótico**

### *Origem e Definição*

Embora o termo “prebiótico” tenha sido adotado somente em 1995 por GIBSON & ROBERFROID, os estudos sobre eles são bem mais antigos. Na década de 50, a descoberta de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial (posteriormente identificado como sendo a lactulose) e potencializam o crescimento das populações de



bifidobactérias e lactobacillus, aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês, incentivou outras explorações sobre o efeito do consumo de compostos não digestíveis sobre a microbiota intestinal.

A partir destes estudos, foi constatado que, apesar de existirem vários compostos resistentes à digestão por ácidos, sais e enzimas produzidos pelo organismo animal (celulose, hemicelulose, amido resistente, oligossacarídeos, compostos fenólicos, etc.), sendo alguns deles potencialmente fermentáveis, nem todos agiam como estimuladores no desenvolvimento dos microrganismos benéficos no TGI. Desta forma, o fato de serem não digeríveis e fermentáveis não significa que atuem como prebióticos. Assim, muitas substâncias classificadas até então como prebióticos apresentavam fermentação não específica. Quando ingeridas estimulavam o crescimento e/ou a atividade metabólica de diferentes espécies bacterianas, incluindo espécies potencialmente nocivas (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Neste contexto, os oligossacarídeos não digestíveis (ONDs) têm sido preferencialmente usados como prebióticos devido a sua maior seletividade fermentativa (SILVA & NÖRNBERG, 2003). Entretanto, nem todos os ONDs são necessariamente prebióticos, já que muitas vezes sua fermentabilidade seletiva é amplamente assumida, porém nem sempre comprovada.

Os prebióticos podem ser definidos como compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas que são seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrointestinal. Estes podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou serem adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (GIBSON & ROBERFROID, 1995; PELÍCIA et al., 2004).

### *Critérios de classificação*

Desde a sua introdução, o conceito de prebióticos chamou muita atenção, estimulando o interesse não só científico como também industrial. Muitos componentes dos alimentos, especialmente oligossacarídeos e polissacarídeos (incluindo a fibra dietética) foram considerados como tendo atividade prebiótica, porém sem a devida consideração dos critérios necessários para esta classificação. Nem todos os

carboidratos dietéticos são prebióticos e critérios claros precisam ser estabelecidos para que um ingrediente possa ser assim considerado. Estes critérios foram definidos por ROBERFROID (2007) da seguinte maneira:

- a) resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas dos mamíferos, e absorção gastrointestinal;
- b) fermentação pela microbiota intestinal; e
- c) estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade metabólica das bactérias intestinais que contribuem à saúde e bem-estar.

A resistência, no primeiro critério, não necessariamente significa que o prebiótico seja completamente indigerível, mas deve se assegurar que uma quantia significativa do composto esteja disponível no intestino grosso para servir como um substrato à fermentação. Embora cada um destes critérios seja importante, o terceiro é o mais difícil de se cumprir.

#### *Mecanismos de ação e efeitos dos prebióticos*

Atualmente, estes compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos “promotores de crescimento” para os animais de produção ou como promotores de saúde e bem estar para animais de companhia, sendo administrados sempre com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal.

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro (MACARI & MAIORKA, 2000), estimulando o crescimento e/ou ativando o metabolismo de algum grupo de bactérias do trato intestinal. De acordo com SILVA & NÖRNBERG (2003), os efeitos resultantes do uso dos prebióticos são evidenciados pelo crescimento das populações microbianas benéficas, pela melhora nas condições luminiais, nas características anatômicas do trato gastrointestinal e no sistema imune e, em alguns casos, pela melhora no desempenho e/ou saúde do animal.

A alteração da microbiota intestinal consequente ao uso de prebióticos pode ocorrer, basicamente, de duas maneiras: pelo fornecimento de nutrientes para as bactérias desejáveis e por exclusão competitiva. Assim, por estes dois mecanismos a

colonização intestinal indesejável é reduzida resultando em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal, tornando esta mais apta para exercer suas funções de secreção, digestão e absorção de nutrientes (SILVA, 2006).

Para que as bactérias indesejáveis consigam colonizar o trato intestinal e criar uma condição de doença precisam inicialmente aderir-se à superfície epitelial dos enterócitos. Esta adesão ocorre através das lectinas ou fímbrias bacterianas, que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, se as bactérias se ligarem a um açúcar ou oligossacarídeo dietético, e não à mucosa intestinal, irão passar com a digesta sem causar transtornos para os animais (SILVA, 2006).

Dessa forma, a exclusão competitiva ocorre quando determinados oligossacarídeos, como os mananoligossacarídeos, atuam diretamente na fase de colonização de bactérias patogênicas. Estes oligossacarídeos se ligam às fímbrias destas bactérias tornando-as indisponíveis para a aderência à mucosa intestinal, fazendo com que percam a sua capacidade de colonização e sejam eliminadas junto com as fezes.

A colonização e a diversidade das populações de microrganismos presentes no TGI são influenciadas por inúmeros fatores, dentre os quais a disponibilidade de nutrientes, o pH luminal, a presença de substâncias antibacterianas naturais (bacteriocinas) e o estímulo do sistema imune.

Quando os prebióticos são adicionados à dieta, a especificidade de sua fermentação estimula o crescimento e a estabilidade das populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos (em especial, ácidos láctico e acético), em detrimento aos demais. Estes compostos reduzem o pH luminal e, juntamente com outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas por esta mesma microbiota, inibem a proliferação dos microrganismos nocivos, tais como *Escherichia coli*, *Clostridium sp.* e *Salmonella*.

Os microrganismos Gram negativos, como a *Salmonella* e *Escherichia coli* são incapazes de fermentar os frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS), podendo ter seu crescimento diminuído quando em presença desses produtos, que

desta forma podem ser utilizados como depressores do crescimento microbiano indesejável (FLEMMING, 2005). A produção de ácidos por bactérias lácticas é outro mecanismo que pode inibir o crescimento de patógenos, seja pela diminuição do pH ou pelo efeito direto dos ácidos sobre as bactérias (PELICANO et al., 2002).

Os prebióticos também podem causar modificações benéficas nas características anatômicas do TGI, promovendo o aumento na área de absorção da mucosa intestinal, devido as suas características tróficas (FERKET, 2004). MACARI & MAIORKA (2000) relataram aumento significativo na altura dos vilos do intestino delgado de pintainhos de 7 dias que receberam 0,2% de MOS na dieta.

Ao estimularem o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico, os prebióticos estão atuando indiretamente de forma benéfica sobre o sistema imune do hospedeiro. Estas populações bacterianas produzem substâncias com propriedades imuno-estimulatórias, incluindo lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos. Tais substâncias interagem com o sistema imune em vários níveis, incluindo produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrófaga e indução de síntese de maiores quantidades de imunoglobulinas, em especial as imunoglobulinas de classe A (MACFARLANE & CUMMINGS, 1999).

O MOS, em adição a estes mecanismos, é capaz de induzir ativação de macrófagos por ocupar sítios receptores de manose nas glicoproteínas da superfície celular do macrófago. Uma vez que três ou mais destes sítios estejam ocupados, inicia-se uma reação em cascata que resulta em ativação dos macrófagos e liberação de citocinas, o que caracteriza ativação da resposta imune adquirida (SILVA, 2006).

O bloqueio dos sítios de adesão de bactérias resulta em melhora na imunidade por permitir que os patógenos sejam apresentados às células imunes como antígenos atenuados. Acredita-se que o MOS possua, também, efeito direto sobre as células imunes do trato gastrintestinal quando absorvidos nas células M, localizadas no interior das placas de Peyer. Desta forma, o MOS estimularia tanto a imunidade sistêmica como a associada ao intestino, atuando como antígeno não patogênico e exercendo efeito semelhante a um adjuvante (LODDI, 2003).

A maioria dos oligossacarídeos não digestíveis estudados atualmente são produtos comerciais obtidos por hidrólise parcial, ácida ou enzimática, de polissacarídeos por reações de transglicosilação. Porém, também podem ser obtidos diretamente de sua fonte natural, como vegetais, leite e parede celular de leveduras (SILVA, 2006). Sementes e raízes de alguns vegetais são as fontes naturais comuns de oligossacarídeos. Chicória, cebola, alho, alcachofra, aspargo, cevada, centeio, bem como soja, grão-de-bico e tremoço são exemplos de vegetais com maior ou menor concentração de oligossacarídeos (ANDREATTI FILHO & SAMPAIO, 2000).

Os oligossacarídeos mais estudados quanto a seu efeito prebiótico na alimentação animal são os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). Os FOS são polímeros ricos em frutose, podendo ser naturais, derivados de plantas (inulina) ou sintéticos, resultante da polimerização da frutose (GIBSON & ROBERFROID, 1995). GOS e MOS podem ser obtidos a partir de parede celular de leveduras. A parede celular de leveduras consiste principalmente de proteína e carboidratos, sendo os carboidratos constituídos por quantidades semelhantes de glucose e manose mais N-acetilglucosamina. O MOS, usado como aditivo de rações, consiste de fragmentos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* com uma estrutura complexa de manose fosforilada, glucose e proteína (FURLAN, 2004).

YANG et al. (2007) citam como principais efeitos positivos da adição de MOS na dieta de frangos de corte a melhora no seu desempenho zootécnico devido a exclusão de algumas bactérias patógenas, modificação da microbiota intestinal, redução na taxa de *turnover* da mucosa intestinal e modulação do sistema imune (SHANE, 2001). Esta redução na carga de bactérias intestinais patogênicas e aumento da área de absorção da mucosa com o uso de MOS também foram evidenciados por OLIVEIRA et al. (2007).

Trabalhos também têm evidenciado melhora no desempenho zootécnico, reduções no colesterol sanguíneo, redução na incidência de tumores, na incidência de diarreias e constipação, aumento na resposta imune, bem como redução na mortalidade e na colonização intestinal por *Salmonella* com o uso de frutoligossacarídeos (FOS) na alimentação animal (PELICANO et al., 2002).

SILVA & NÖNRBERG (2003), ao realizarem compilação de dados observaram que a adição de prebióticos às dietas de diferentes espécies de não ruminantes variou de 0,1 a 5% o que, provavelmente, também influencia no tipo de resposta obtida. Eventuais sub-doses podem causar efeito limitado ou nulo sobre a microbiota. Já uma superdosagem pode provocar um desequilíbrio sobre as populações microbianas. Relatam, ainda, que doses elevadas de frutoligossacarídeos causam efeito laxativo e excesso na produção de gases em humanos, o que caracteriza um desequilíbrio na microbiota do TGI. O efeito adverso mais comum do alto consumo de prebióticos é a intolerância gastrointestinal (DZANIS, 2003).

## **2.5. Caracterização da parede celular de levedura**

Leveduras são fungos que possuem fundamentalmente a mesma estrutura subcelular de células animais e vegetais (OSUMI, 1998). São microrganismos unicelulares, com tamanho que varia de 5 a 10 microns. As espécies variam entre si segundo a morfologia ou forma, metabolismo com relação a diferentes substratos, modo de reprodução e onde são encontrados. Enquanto existem aproximadamente 50.000 espécies de fungos, existem apenas 60 gêneros diferentes de leveduras, com aproximadamente 500 espécies diferentes (STONE & MILLS, 2006).

Sua parede celular, por outro lado, é estrutura exclusiva das leveduras, que não ocorre em células animais. Sua parede celular, situada em sua superfície exterior, desempenha papel importante no transporte de moléculas para dentro e fora da célula (OSUMI, 1998). Esta é resistente, durável e elástica. De acordo com ROBINOW & JOHNSON (1991), a espessura da parede pode variar entre 150 a 400 nm, dependendo da espécie e das condições de cultivo do microrganismo. A função básica é a de proteger o protoplasma que envolve. Confere formato único à célula através da sua organização macromolecular, sendo este controlado geneticamente.

A parede celular possui várias enzimas associadas, responsáveis pela hidrólise extracelular de nutrientes ou de macromoléculas durante a morfogênese celular.

Algumas macromoléculas da parede participam na reação de agregação celular que ocorre durante a reprodução e floculação, servindo tanto como receptores específicos e inespecíficos para outras moléculas, como hormônios da reprodução. Outras funções desta organela multifuncional incluem interação celular, recepção, ligação e atividade enzimática especializada (FLEET, 1991).

Sua composição inclui principalmente polissacarídeos complexados à proteínas. Os principais polissacarídeos que a estruturam são a glicose e a manose, seguidos pela galactose, xilose, N-acetil-D-glucosamina, ácidos urônicos e outros componentes secundários. A composição química qualitativa da parede celular é característica de cada espécie, podendo ser empregada como marcador taxonômico. Já as proporções quantitativas dos componentes da parede celular podem variar de acordo com as condições de cultivo e idade das células (FARKAŠ, 1989).

Quase 75% do peso seco da parede celular das leveduras é representado pelos polissacarídeos, integrados por um complexo de  $\beta(1,3)$ - e  $\beta(1,6)$ -D-glucano e quitina mais componentes amorfos denominados mananoproteínas. Enquanto os  $\beta$ -D-glucanos e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem sua forma, as mananoproteínas e sua porção de carboidrato  $\alpha$ -D-manano são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio-ambiente e determinam a especificidade imunológica de leveduras. De forma interessante, os dois principais polissacarídeos constituintes da parede celular das leveduras -  $\beta$ -D-glucanos e  $\alpha$ -D-manano - têm sido recentemente reconhecidos como capazes de promover modulação do sistema imune de diversos organismos vivos, desde insetos a humanos, mediante interações específicas com diferentes células imunocompetentes (GARCIA, 2008).

Desta forma, nos últimos anos, atenção tem sido dada aos vários tipos de polissacarídeos imunomoduladores presentes na parede celular de fungos e leveduras. Assim, ampla variedade de polissacarídeos foi descrito em cogumelos, como escleroglucano, lentinano, grifolano capazes de modificar as respostas biológicas por meio de mecanismos mediados pelo sistema imune, incluindo estimulação das funções imunes não específicas. Neste contexto, a parede celular de levedura do fermento de

pão foi o primeiro produto de levedura definido como farmacêutico, com atividade imunoestimulatória. Seu componente ativo foi identificado como  $\beta$ -glucano. Mais tarde, verificou-se em estudos *in vitro* e em mamíferos que este polissacarídeo insolúvel em água possui a capacidade de melhorar a atividade fagocítica, atividade citotóxica nos macrófagos e outras atividades biológicas. *In vitro*, estes efeitos se manifestam por interações com receptores solúveis ou celulares do sistema imune inato (GARCIA, 2008).

Em alimentos para cães e gatos as leveduras, em suas várias formas (integral ou isolada) têm sido utilizadas por inúmeras razões, incluindo-se aumento de palatabilidade, como fonte de nutrientes, para melhora da textura ou digestibilidade da dieta e para melhorar a saúde e bem estar do animal. Inúmeros produtos comerciais de levedura, desenvolvidos especificamente para uso na alimentação animal e em *petfood*, estão disponíveis atualmente (SWANSON & FAHEY, 2006).

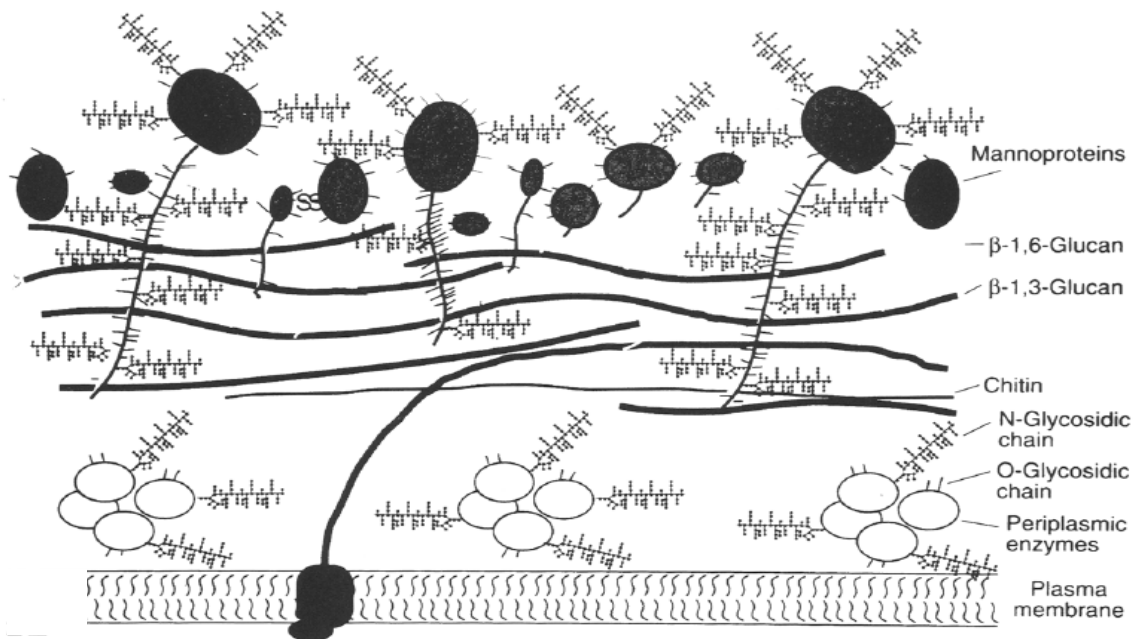
Várias cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são usadas na produção de pães, cervejas, destilados e vinho. Embora estas cepas compartilhem características comuns, como eficiência na utilização de açúcar, alta tolerância e alta produção de etanol, alto rendimento e taxa de fermentação, estabilidade genética, dentre outros, ela também possuem propriedades específicas a cada uma (SWANSON & FAHEY, 2006; SWANSON & FAHEY, 2007). Oito produtos de levedura são atualmente definidos pela *Association of American Feed Control Officials*, estes se diferenciam segundo a fonte da levedura e características como concentrações de umidade e proteína bruta e atividade fermentativa (SWANSON & FAHEY, 2007). Dentre os principais produtos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizados em *petfood* encontram-se a levedura de cervejaria e a parede celular de levedura de cana-de-açúcar seca.

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* representa aproximadamente 15-30% do peso seco da célula. Esta consiste principalmente em mananoproteínas,  $\beta$ -glucanos, e quitina (N-acetilglicosamina), unidos por ligações covalentes. A porção de glucanos consiste de cadeias  $\beta$ (1,3)- e  $\beta$ (1,6)-. Os  $\beta$ (1,3)-glucanos formam o esqueleto interno da célula, sendo os principais componentes estruturais responsável por sua força mecânica. Esta estrutura de glucanos é altamente ramificada e possui múltiplas



extremidades não redutíveis que funcionam como locais de ligação para outros componentes da parede celular (KÓLLAR et al., 1997).

$\beta(1,6)$ -glucanos encontram-se principalmente fora da estrutura de sustentação e freqüentemente estão ligados por proteínas da parede celular. Manano polissacarídeos estão unidos a proteínas para formar uma camada de mananoproteínas localizada na superfície externa da parede celular da levedura.



**Figura 1.** Figura esquemática apresentando a composição e estrutura da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: OSUMI (1998).

Duas classes de proteínas de parede celular, ligadas covalentemente, foram identificadas. A primeira classe consiste em proteínas de glicosil fosftidilinositol, estas formam um complexo com as cadeias  $\beta(1,3)$  - e  $\beta(1,6)$  (KOLLÁR et al., 1997). A segunda classe de proteínas a parede celular, a proteína com repetições internas, está ligada diretamente aos  $\beta(1,3)$ -glucanos. Mananoproteínas são estritamente reguladas pelas mudanças nas condições externas (por exemplo, choque térmico, choque hiposmótico, fonte de carbono) e mudanças internas durante o ciclo de divisão da célula (SWANSON & FAHEY, 2006; SWANSON & FAHEY, 2007).

Enquanto glucanos e mananoproteínas são os componentes principais da parede celular, apresentando-se em proporções aproximadamente iguais, a quitina constitui apenas 1 a 3% desta estrutura. Embora presente em quantidades pequenas, é o componente principal do septo primário, envolvido na separação da célula mãe das filhas, tornando-se essencial para divisão celular.

ROBINOW & JOHNSON (1991) realizaram levantamento de diversos estudos sobre a composição da parede celular de leveduras e definiram que a parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* é composta por 29% de glucanos, 30% de mananos, 13% de proteínas, 8,5% de lipídios e 1% de quitina. Para FLEET (1991) a composição da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* pode variar, possuindo entre 30 a 60% de glucanos, 25 a 50% de mananos, 13 a 15% de proteína, 2 a 14% de lipídio e 1 a 2% de quitina. Os componentes restantes da levedura, após extração da parede celular, são coletivamente chamados extrato celular de levedura e contêm numerosos nucleotídeos, enzimas, vitaminas, e minerais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e no Laboratório de Microbiologia Aplicada à Zootecnia do Departamento de Patologia Veterinária, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Jaboticabal, sob o protocolo de número 024683-06, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados oito cães da raça Beagle, machos ou fêmeas, não castrados, com peso médio de  $11,45 \pm 2,54$  Kg, idade média de  $7,0 \pm 3,20$  anos, procedentes do canil do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal. O estado de saúde foi confirmado previamente ao início do experimento por meio de exames físico, sanguíneo e coproparasitológico.

#### **3.2. Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido na forma de dois quadrados latinos 4 x 4, incluindo cada um quatro tratamentos e quatro períodos, gerando 8 repetições por tratamento.

Cada período do quadrado latino teve duração de 21 dias, divididos em três etapas conforme descrito na Tabela 1. Ao término de cada período de 21 dias, os animais eram pesados e tinham a quantidade de alimento reajustada de forma a assegurar a manutenção do peso inicial.

**Tabela 1.** Procedimentos realizados em cada etapa dos períodos experimentais.

| <b>Etapa</b> | <b>Dias do período experimental</b> | <b>Procedimentos realizados</b>  |
|--------------|-------------------------------------|--|
| 1            | 1 a 15                              | Adaptação à dieta  |
| 2            | 16 a 20                             | Coleta total de fezes para o ensaio de digestibilidade   |
| 3            | 21                                  | Coleta de fezes frescas para análise da composição microbiológica, concentração de ácidos graxos de cadeia curta e aminas biogênicas fecais. Coleta de sangue para realização de hemograma, determinações bioquímicas e imunofenotipagem de linfócitos |

Na etapa 1 (primeiros 15 dias) os cães foram alojados em duplas em baias com solário, medindo 1,5m x 4m. Nas etapas 2 e 3 permaneceram em gaiolas metabólicas individuais em inox, com dimensões de 90 x 90 x 100 cm, com aparato para coleta separada de fezes e urina.

### 3.3. Dietas experimentais

Foram empregadas quatro rações extrusadas isonutrientes, à base de proteína animal e arroz, formuladas de modo que suas composições nutricionais atendessem as recomendações da Association of American Feed Control Official (AAFCO, 2004) para cães adultos em manutenção. Estas foram produzidas na indústria de *petfood* Premier Pet, em Dourado - São Paulo.

Os tratamentos experimentais corresponderam a quatro níveis de inclusão da parede celular de levedura seca (PCL), com base na matéria natural. Estes ficaram assim distribuídos:

T-0 – dieta controle, com 0% de PCL

T-15 – 0,15% de PCL

T-30 – 0,30% de PCL

T-45 – 0,45% de PCL

A PCL empregada no experimento (ActiveMOS<sup>®</sup>, Biorigin, Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil) é derivada de *Saccharomyces cerevisiae*. A composição química do ingrediente, segundo o fabricante, está descrita na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição química do ActiveMOS<sup>®</sup> segundo o fabricante.

| Item                 | %          |
|----------------------|------------|
| Proteína bruta (máx) | 30,0       |
| Umidade (máx)        | 8,0        |
| Fibra bruta (máx)    | 3,0        |
| Cinzas (máx)         | 6,0        |
| Carboidratos         | 55,0       |
| Mananoligossacarídeo | 25,0 ± 3,0 |
| β-glucano            | 30,0 ± 3,0 |

A PCL foi incluída na fórmula em substituição ao amido de milho, permanecendo os demais ingredientes em porcentagens fixas. Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, de modo a não permitir variabilidade entre os tratamentos. A fórmula e a composição química das dietas encontram-se nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

**Tabela 3.** Fórmula das dietas experimentais. Valores sobre a matéria original.

| <b>Ingrediente</b>                       | <b>%</b> |
|--|----------|
| Parede celular de levedura               | 0 – 0,45 |
| Amido de milho                           | 0 – 0,45 |
| Farinha de vísceras de frango            | 36,0     |
| Quirera de arroz                         | 30,0     |
| Milho                                    | 20,0     |
| Óleo de vísceras frango                  | 8,2      |
| Polpa de beterraba                       | 2,0      |
| Palatabilizante                          | 2,0      |
| Sal                                      | 0,3      |
| KCl                                      | 0,4      |
| Antifúngico                              | 0,1      |
| Premix vitamínico e mineral <sup>1</sup> | 0,52     |
| Antioxidante                             | 0,006    |

<sup>1</sup> Adição por quilograma de dieta: Ferro 100 mg, Cobre 10 mg, Manganês 10 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Selênio 0,3 mg, Vitamina A 18000 UI, Vit. D 1200 UI, Vit. E 200 UI, Tiamina 6 mg, Riboflavina 10 mg, Ácido pantotênico 40 mg, Niacina 60 mg, Piridoxina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,1 mg e Colina 2000 mg.

**Tabela 4.** Composição química analisada das dietas experimentais <sup>1</sup>.

| <b>Item</b>              | <b>Dietas <sup>2</sup></b>   |             |             |             |
|--------------------------|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                          | <b>T-0</b>                   | <b>T-15</b> | <b>T-30</b> | <b>T-45</b> |
| Matéria seca (%)         | 92,41                        | 91,53       | 91,63       | 91,76       |
|                          | Valores sobre a matéria seca |             |             |             |
| Matéria Mineral (%)      | 7,70                         | 7,66        | 7,37        | 7,29        |
| Matéria orgânica (%)     | 92,30                        | 92,34       | 92,63       | 92,71       |
| Proteína bruta (%)       | 34,08                        | 33,13       | 32,13       | 32,77       |
| Extrato etéreo ácido (%) | 15,72                        | 14,37       | 15,71       | 15,03       |
| Fibra bruta (%)          | 2,27                         | 2,56        | 2,70        | 2,29        |
| Energia Bruta (kcal/kg)  | 5051,62                      | 4971,64     | 5057,06     | 4988,49     |

<sup>1</sup> - n=2; CV < 5%

<sup>2</sup> - T-0 - dieta controle, com 0% de PCL; T-15 - 0,15% de PCL; T-30 - 0,30% de PCL; T-45 - 0,45% de PCL

No delineamento quadrado latino todos os cães receberam as quatro dietas experimentais, sendo aleatoriamente sorteados dentre as possíveis seqüências de oferecimento dos alimentos. A quantidade de ração administrada foi calculada de acordo com o valor energético da ração e a necessidade energética do animal (NRC, 2006). A quantidade total diária foi dividida em duas refeições iguais, oferecidas as 08:30 e 17:30 horas. O consumo de alimento foi mensurado e anotado durante todo o experimento.

### **3.4. Parâmetros avaliados**

#### **3.4.1. Digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade fecal**

O ensaio de digestibilidade foi conduzido pelo método de coleta total de fezes e urina, considerando-se as recomendações da AAFCO (2004). As dietas foram oferecidas por um período de adaptação de quinze dias, seguidos de cinco dias de coleta, obtendo-se um conjunto de fezes e urina de cada animal. A água foi fornecida à vontade. Os animais foram alojados em gaiolas de metabolismo individuais, em aço inoxidável, com dimensões de 90cm x 100cm x 90cm, equipadas com aparatos para coleta separada de fezes e urina.

O consumo alimentar foi registrado diariamente, pesando-se as quantidades oferecidas e recusadas de alimento a cada refeição. As fezes foram colhidas integralmente duas vezes ao dia, as 08:00hs e 17:00hs, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. A urina foi recolhida duas vezes ao dia, em recipientes plásticos colocados sob o funil coletor da gaiola, contendo um mililitro de ácido sulfúrico 1N para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. Logo após a colheita foi mensurado o volume de urina produzida sendo esta, então, armazenada em garrafa plástica identificada e mantida em freezer (-15°C) até realização das análises laboratoriais.

Ao final do período de coleta, as fezes foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra única por animal e período, pesadas e secas em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo) a 55 °C durante 72 horas. As fezes pré-secas e as rações foram, então, moídas em moinho de facas (MOD 340, ART LAB, São Paulo) com peneira de 1mm, para proceder-se às análises laboratoriais. Quanto a urina, foram colocados 30mL em placas de petri e esta foi mantida em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo) a 55°C, por 24 horas, para redução do volume. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando 90mL.

Nas fezes e rações foram determinados, segundo a metodologia descrita pela Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), matéria mineral (MM) e fibra bruta (FB).

A energia bruta (EB) das fezes, rações e urina foram determinadas em bomba calorimétrica (1281, PARR Instrument Company, Illinois, EUA). Para isto, as amostras de fezes, ingrediente e rações foram peletizadas e pesadas e o concentrado de urina foi colocado em cápsulas de silicone para se proceder a combustão. Os extrativos não-nitrogenados (ENN) foram calculados pela diferenças entre a MS e a soma da PB, EEHA, FB e MM.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, extrato etéreo hidrólise ácida, extrativos não-nitrogenados e fibra bruta das rações. Estes cálculos foram realizados com a seguinte fórmula:

$$\text{CDAN (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

Foram avaliadas, também, a produção e qualidade das fezes. A matéria seca das fezes foi determinada pela seguinte fórmula:



$$\text{MS fecal} = \frac{1^{\text{a}} \text{ MS} \times 100}{2^{\text{a}} \text{ MS}}, \text{ onde:}$$

1ª MS = matéria seca a 55 °C das fezes *in natura*

2ª MS = matéria seca a 105°C das fezes pré-secas a 55°C.

Foram determinadas, ainda, a produção de fezes por cão por dia, tanto em matéria seca como natural, a produção de fezes por quilograma de peso vivo por dia e a produção de fezes, tanto na matéria seca como natural, por 100 gramas de ração ingerida.

A análise qualitativa das fezes foi determinada por meio do escore fecal, atribuindo-se notas de 0 a 5, sendo: 0 = fezes líquidas; 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes que não marcam o piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas, considerando-se normal valores entre 3 e 4. Para determinação do pH das fezes 2,0 gramas de fezes frescas foram diluídos (1:10 p/v) em água mili-Q e o pH medido com pH-metro de precisão 0,01 pH (modelo DM20, Digicrom Analítica Ltda, São Paulo).

### 3.4.2. Composição microbiológica das fezes

Amostras de fezes frescas foram colhidas de forma asséptica, mantidas em pote coletor universal estéril e levadas para procedimento analítico com no máximo 30 minutos após sua coleta, de forma a se manter a viabilidade dos microrganismos presentes. No Laboratório de Microbiologia Aplicada à Zootecnia, de cada amostra fecal foram pesadas 25 gramas, homogeneizadas, diluídas em série com água salina estéril até  $10^{-6}$  e, logo após, semeadas para contagem dos microrganismos utilizando-se de meios e condições apropriadas para cada tipo de bactéria, conforme descrito na Tabela 5.

**Tabela 5.** Métodos empregados para cultura das bactérias em estudo.

| Bactéria                | Meio de cultura                   | Fabricante            | Condições de incubação* |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Aeróbios totais         | Plate Count Agar (PCA)            | Acumedia <sup>1</sup> | A, 37°C, 24h            |
| Anaeróbios totais       | Plate Count Agar (PCA)            | Acumedia <sup>1</sup> | AN, 37°C, 24h           |
| <i>Escherichia coli</i> | Agar MacConkey                    | Acumedia <sup>1</sup> | A, 37°C, 24h            |
| <i>Bifidobacterium</i>  | Bifidobacterium agar              | Himedia <sup>2</sup>  | AN, 37°C, 24h           |
| <i>Clostridium</i>      | Reinforced Clostridium Agar (RCA) | Oxoid <sup>3</sup>    | AN, 37°C, 48h           |
| <i>Lactobacillus</i>    | Man Rogosa Sharpe (MRS)           | Acumedia <sup>1</sup> | AN, 37°C, 72h           |

\* Necessidade de oxigênio, temperatura e tempo de incubação. Legenda: A = aerobiose, AN = anaerobiose

A contagem total, em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g de fezes), de cada um dos gêneros em estudo foi realizada pela técnica de contagem padrão em placas. As diluições foram semeadas em duplicatas em placas de petri descartáveis pela técnica de *pour plate* e incubadas conforme a sua necessidade de oxigênio. As bactérias aeróbias (*Escherichia coli* e aeróbios totais), após semeadura foram incubadas a 37°C, em aerobiose, por 24 a 48 horas. As bactérias anaeróbias (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e anaeróbios totais) foram incubadas em jarras de anaerobiose com o sistema gás-pack a 37°C por 24 a 72 horas. Para o gênero *Clostridium* as amostras, nas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , foram submetidas a choque térmico prévio a semeadura, para ativar a germinação dos esporos e destruir contaminantes não esporulados, que consistiu em mantê-las em banho-maria a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento em água com gelo por mais 10 minutos. Após este procedimento as amostras eram semeadas em placas e incubadas como descrito anteriormente

Além dessas bactérias foi feita pesquisa de *Salmonella* em todas as amostras colhidas. Para isto, realizou-se enriquecimento seletivo de uma alíquota de três mililitros

<sup>1</sup> Acumedia Manufacturers Inc., Miami, EUA

<sup>2</sup> Himedia Laboratories, Mumbai, India

<sup>3</sup> Oxoid Ltd, Cambridge, Reino Unido

das amostras na diluição de  $10^{-1}$  em dois tubos de ensaio com os meios caldo Rappaport Vassiliadis (Acumedia Manufacturers Inc., Miami, EUA) e caldo Selenito (Acumedia Manufacturers Inc., Miami, EUA) acrescido de Novobiocina. Estas foram incubadas a 42°C e 37°C, respectivamente, por 24 horas. Após este período foram semeadas em placas com ágar MacConkey pela técnica de esgotamento e incubadas a 37°C por mais 24 horas. Após este período, colônias características, incolores e com meio básico na cor palha indicariam a presença de *Salmonella* (CORTEZ et al., 2004).

Após incubação procedeu-se a contagem das placas e cinco colônias típicas foram submetidas a esfregaços corados pelo método de Gram para confirmação das características morfológicas de cada gênero.

**Tabela 6.** Características morfo-tinturiais dos gêneros de bactérias em estudo, em esfregaços corados pelo método de Gram.

| Gênero                  | Morfologia e coloração de Gram   |
|-------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> | Bastonetes retos pequenos, Gram negativos  |
| <i>Bifidobacterium</i>  | Bastonetes curvos com morfologia variável mas comumente em forma de V, Gram positivos, podendo apresentar-se isolados, pareados ou agrupados |
| <i>Clostridium</i>      | Bastonetes curtos com extremidades arredondadas, Gram positivos, formadores de esporo  |
| <i>Lactobacillus</i>    | Bastonetes finos e longos, Gram positivos  |

Fonte: HOLT et al. (1994).

Algumas colônias também foram submetidas a kits específicos para identificação. Estes são sistemas miniaturizados com galerias contando com 49 carboidratos diferentes. São preparados inoculos em solução de cloreto de sódio a 0,85%, com a cultura teste purificada, que é colocada em cada um dos poços contendo carboidrato. Após a preparação e inoculação das galerias, estas foram incubadas nas condições específicas para os gêneros testados conforme orientação do fabricante. A leitura foi realizada pela adição de reagentes e observação da mudança de cores nas galerias, devido a alterações no pH, indicando positividade ou não às reações. Os kits

API utilizados foram: Kit API 50CH + 50CHL para Lactobacilos, Kit API 20E para Enterobactérias e Kit API 20A para Anaeróbios (BioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, França). Estes testes foram realizados apenas no primeiro período experimental como confirmação da metodologia utilizada. O alto custo dos kits inviabilizou sua utilização nos demais períodos experimentais.

### **3.4.3. Concentração fecal dos ácidos graxos de cadeia curta**

Com o intuito de se verificar a fermentabilidade do ingrediente teste pelas bactérias da microbiota intestinal, bem como de possíveis alterações no padrão fermentativo da eubiota, foi determinada a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico) e ácido láctico nas fezes dos animais. Para tanto, foram colhidas 10 gramas de fezes frescas, que foram rapidamente homogeneizadas e misturadas à 30mL de solução de ácido fórmico a 16% (1:3 p/v). Esta mistura foi mantida sob refrigeração por três dias, sendo, então, centrifugada por três vezes a 5.000 rpm, à 15°C, por 15 minutos, sendo sempre aproveitado o sobrenadante e desprezado o sedimento. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C) e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – Pirassununga-SP.

A concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes (acético, propiônico e butírico) foi determinada por cromatografia gasosa (Finningan 9001) de acordo com ERWIN et al. (1961), sendo a coluna de vidro de 2 metros de comprimento, diâmetro de 1/8", empacotada com 80/120 Carbowax B-DA/4% Carbowax 20M. O cromatógrafo foi calibrado por meio da injeção de 1 µL de solução padrão misto e a curva pré-estabelecida no software BORWIN versão 1.21.60 (Grupo Intecrom, São Paulo). Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste (vazão de 25 mL/min), oxigênio como gás comburente (vazão de 175 mL/min) e hidrogênio como gás combustível (vazão de 15 mL/min.), sendo as temperaturas de operação de 220°C no injetor, 210°C na coluna e 250°C no detector de ionização de chama.

A amostra líquida, previamente centrifugada, foi injetada e vaporizada percorrendo, com auxílio de um gás de arraste (Nitrogênio) uma coluna empacotada com Carbopack/Carbowax. Nesta coluna os ácidos vaporizados mais leves percorrem mais rapidamente a coluna, atingindo o detector de ionização de chama. Neste, a corrente formada pela ionização da chama com o ácido é coletada e enviada a um computador na forma de impulso elétrico. Este calcula a concentração da amostra e compara as áreas dos picos formados pela intensidade dessa corrente, com a área dos picos formados pela solução contendo o ácido padrão. Desta forma, calcula-se a concentração da amostra através de uma regra de três simples.

Foi mensurado, também, o teor de ácido láctico das fezes empregando-se a mesma amostra na qual foram avaliados os ácidos graxos de cadeia curta. A análise foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – Pirassununga, de acordo com PRYCE (1969) pelo método espectrofotométrico a 565 nm (500 a 570nm), utilizando branco reagente a fim de calibrar o espectrofotômetro (QUICK-Lab, Drake Eletrônica Comércio Ltda, São José do Rio Preto, SP). A quantificação se deu pela comparação da leitura das amostras com padrão de ácido láctico a 0,08%.

#### **3.4.4. Concentração fecal de aminas bioativas**

Para a avaliação da concentração fecal de aminas bioativas, 5 gramas de fezes frescas foram homogeneizadas e misturadas a sete mililitros (5:7 p/v) de ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%), agitadas por 3 minutos em vortex e centrifugadas a 10.000 x g, por 20 minutos a 4°C (Centrífuga Modelo RC 5C plus, Sorvall Products, Newtown, CT, EUA). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo e o resíduo extraído por mais duas vezes, empregando-se respectivamente volumes de sete e seis mililitros de TCA, sendo os sobrenadantes filtrados e combinados. O volume final obtido foi anotado e congelado. As amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório de Bioquímica de Alimentos no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG – Belo Horizonte, MG. O método utilizado foi o de cromatografia

líquida de alta performance (HPLC, Shimadzu modelo LC-10AD, Kyoto, Japão) por par iônico, derivação pós-coluna com o-ftalaldeído e detecção fluorimétrica, seguindo a metodologia descrita por VALE & GLORIA (1997).

#### **3.4.5. Hemograma e determinações bioquímicas**

Realizou-se hemograma, mensuração da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e dos níveis séricos de uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol. Estes exames foram feitos no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – Unesp, campus de Jaboticabal. Estas análises foram realizadas antes do início do experimento e ao final de cada período experimental (dia 21 do período no quadrado latino).

Os animais foram submetidos à venipunção jugular de onde foram colhidos cinco mililitros de sangue. Em ato contínuo, a amostra foi dividida em duas alíquotas de quatro e um mililitro transferidas para um tubo de ensaio sem anticoagulante e outro contendo anticoagulante EDTA, respectivamente.

As contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, a taxa de hemoglobina, o volume globular ou hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos com auxílio de um contador veterinário automático de células ABC Vet (Horiba ABX Brasil, São Paulo). A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida utilizando-se de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de Metanol – May Grunwald – Giemsa (MGG) e avaliados a microscopia óptica. A fórmula leucocitária absoluta foi obtida a partir das contagens global e diferencial das células leucocitárias, por uma regra de três direta. As determinações dos níveis séricos de colesterol, triglicérides, proteínas totais, albumina, creatinina, uréia e a atividade das enzimas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina foram conduzidas com auxílio de conjuntos de reagentes específicos para cada parâmetro (Labtest Diagnóstica Ltda, Lagoa Santa - MG), sendo as leituras realizadas

em aparelho analisador bioquímico semi-automático (modelo LABQUEST, Labtest Diagnóstica Ltda, Lagoa Santa – MG).

#### **3.4.6. Imunofenotipagem de linfócitos**

Para a realização da análise citofluorométrica do sangue periférico, foram utilizadas amostras de sangue obtidas por venipunção jugular. Os cães foram submetidos à análise quantitativa de células  $CD5^+CD4^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD5^+CD8^+$ ,  $CD45^+$  e  $CD45^+CD21^+$ , realizada por imunofenotipagem de linfócitos. A imunofenotipagem foi obtida por citometria de fluxo, que permite análise rápida, objetiva e quali-quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001), por meio da identificação e quantificação de células com base no tamanho, na granularidade e na intensidade de fluorescência (ROITT et al., 1999).

#### **Escolha dos marcadores**

Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). O termo CD (Cluster Differentiation = denominação de grupamento) é utilizado para denominar os anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios, e em diferentes partes do mundo, contra antígenos leucocitários humanos (ROITT et al., 1999).

No “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (FIRST CLAW – First Canine Leukocyte Antigen Workshop), ocorrido em Cambridge, Reino Unido, em 1993, foram definidos os anticorpos monoclonais que marcam os antígenos leucocitários caninos (COBBOLD & METCALFE, 1994). Neste evento o CD5 foi definido como principal marcador de superfície para células linfocitárias pan-T caninas, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e o CD8 como marcador de linfócitos T citotóxicos (COBBOLD & METCALFE, 1994). De acordo com BYRNE et al. (2000), os linfócitos B de cães, diferentemente daqueles de humanos e de roedores, não expressam CD5. Portanto, o CD5 canino deve ser utilizado como marcador para células

pan-T. Os linfócitos T têm sido mais extensivamente estudados com respeito à expressão diferencial de antígenos. A maioria dos linfócitos T são identificados pela expressão dos antígenos CD4 e CD8 (LAYNER, 2002).

No cão o CD4 é expresso pelo MHC de classe II restrito a células T-helper. Os neutrófilos caninos podem expressar CD4 e isto difere os neutrófilos caninos dos neutrófilos de outras espécies. Monócitos, macrófagos e células dendríticas também podem expressar este antígeno em algumas situações. O CD5 é expresso por células T maduras, timócitos e algumas células B. Nas células T maduras, o CD5 atua como co-estimulador de receptor de sinais. O CD8 é expresso pelo MHC de classe I restrito a células T-citotóxicas, porém algumas células NK podem expressar o CD8. Já o CD 21 é expresso por células B maduras e células dendríticas foliculares no centro germinativo (VERNAU, 2004). Aproximadamente 10% da superfície dos linfócitos T encontra-se recoberta pela molécula CD45. Esta molécula tem função no controle da transdução do sinal pelos receptores de célula T. Identificaram-se várias formas diferentes de CD45. As células T virgens possuem uma forma de CD45, e as células T estimuladas e de memória possuem uma forma diferente (TIZARD, 2002)

Diante do exposto, neste estudo foi utilizado para marcar os linfócitos T helper, o CD4, considerando que este age como receptor de células T para moléculas de MHC de classe II além de exercer um papel-chave no reconhecimento de antígeno processado por parte das células T auxiliares. Todavia, como esta molécula é expressa também em neutrófilos de cães, optou-se pela dupla marcação com a molécula CD5 para selecionar mais especificamente as células T auxiliares (TIZARD, 2002; AbD Serotec, 2008).

Para marcar os linfócitos T citotóxicos utilizou-se o CD8, que é um receptor para moléculas de MHC de classe I e exerce papel-chave no reconhecimento de antígenos endógenos. O anticorpo utilizado no presente estudo se liga ao CD8 a. Para uma marcação mais fidedigna dos linfócitos T citotóxicos, utilizou-se também dupla marcação com o CD5 (TIZARD, 2002; AbD Serotec, 2008).

Para marcação de linfócitos B, utilizou-se o CD21, um receptor de complemento também chamado de CR2, uma glicoproteína de 145kDa, encontrada nas células B.



Embora TIZARD (2002) afirme que esta molécula também está presente em algumas células dendríticas e em algumas células T, o fabricante não faz nenhuma referência a este fato. Também se realizou dupla marcação deste com o CD45, pertence à família de glicoproteínas de 190 a 220kDa, encontradas em todas as células de origem hematopoiética, exceto hemácias, fazendo-se assim marcação mais precisa do CD21 (TIZARD, 2002; AbD Serotec, 2008). Em resumo, os anticorpos monoclonais selecionados para a presente pesquisa encontram-se caracterizados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo.

| Molécula | Fluorescência | Anticorpo Monoclonal | Tipo celular             | Fabricante  |
|----------|---------------|----------------------|--------------------------|-------------|
| γ1       | PE            | R104                 | Isotipo controle         | AbD Serotec |
| γ2       | FITC          | MCA1212              | Isotipo controle         | AbD Serotec |
| CD5      | FITC          | MCA1037              | Linfócitos T             | AbD Serotec |
| CD4      | PE            | MCA1038              | Linfócitos T helper      | AbD Serotec |
| CD8      | PE            | MCA1039              | Linfócitos T citotóxicos | AbD Serotec |
| CD45     | FITC          | MCA1042F             | Leucócitos               | AbD Serotec |
| CD21     | PE            | MCA1781              | Linfócitos B             | AbD Serotec |

### **Processamento das amostras para citometria de fluxo**

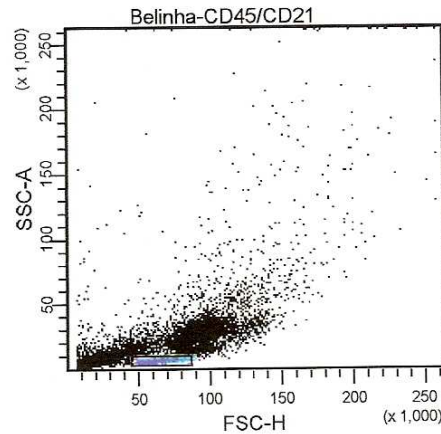
As amostras foram processadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Unesp, utilizando-se de cinco tubos falcon, preparados como descrito na Tabela 8. Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a colheita do sangue.

**Tabela 8.** Preparação das amostras de sangue para análise citométrica.

| Tubo | Amostra | Volume Anticorpo | Molécula     | Fluorescência |
|------|---------|------------------|--------------|---------------|
| 1    | 100µL   | -                | -            | -             |
| 2    | 100µL   | 2µL<br>2µL       | γ1<br>γ2     | PE<br>FITC    |
| 3    | 100µL   | 2µL<br>2µL       | CD5<br>CD4   | FITC<br>PE    |
| 4    | 100µL   | 2µL<br>2µL       | CD5<br>CD8   | FITC<br>PE    |
| 5    | 100µL   | 2µL<br>2µL       | CD45<br>CD21 | FITC<br>PE    |

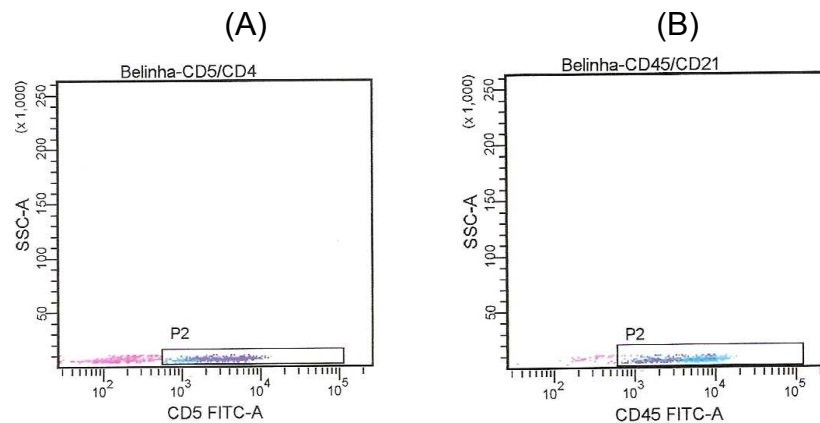
As amostras eram homogeneizadas e os tubos incubados no escuro, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado em cada tubo e, novamente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por dez minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por três vezes, adicionando-se dois mililitros de PBS por lavagem. Após as lavagens, foi adicionado 0,5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) a 1% em formol.

As amostras foram analisadas no citofluorômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), no Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp. Utilizou-se o programa FACSDiva (Becton Dickinson, San Jose, CA), para identificar e quantificar as células CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>. Foi realizado um *gate* (P1) sobre a população de linfócitos do sangue obtendo-se 10000 eventos da população demarcada (figura 2).

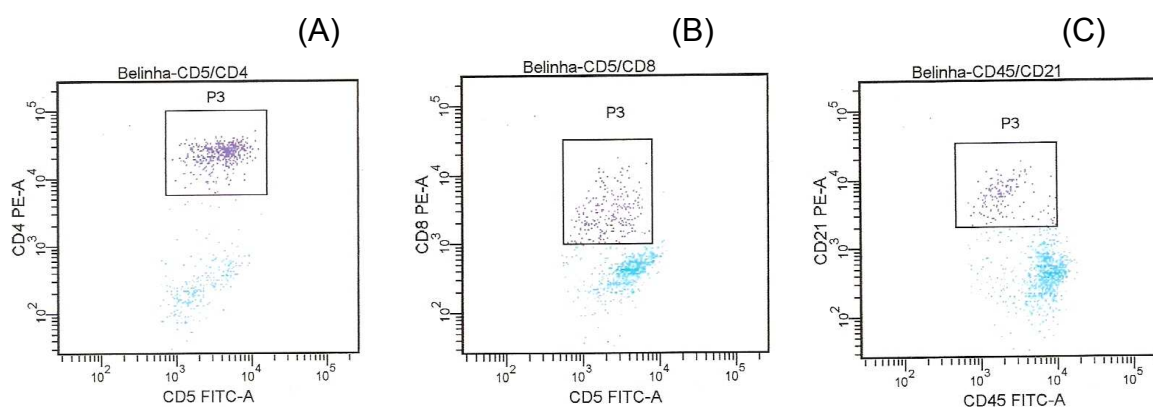


**Figura 2.** Representação gráfica da distribuição das populações leucocitárias observadas na citometria de fluxo, de acordo com a complexidade e o tamanho das células, com o *gate* sobre a população de linfócitos.

Na sequência era realizado um novo *plot* com a população linfocitária e um novo *gate* (P2) era colocado para se obter as subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup> ou CD45<sup>+</sup> (figura 3). Outro *plot* foi realizado com a população CD5<sup>+</sup> ou CD45<sup>+</sup> e outro *gate* foi colocado para se obter as populações CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (figura 4). Desta forma foram obtidos os valores relativos e, com a contagem absoluta de linfócitos, os valores absolutos das subpopulações linfocitárias.



**Figura 3.** Representação gráfica da distribuição das células de acordo com a complexidade interna ("Side Scatter – SSC"), com a *gate* (P2) das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup> (A) e CD45<sup>+</sup> (B).



**Figura 4.** Representação gráfica das subpopulações linfocitárias (gate - P3)  $CD5^+CD4^+$  (A),  $CD5^+CD8^+$  (B) e  $CD45^+CD21^+$  (C).

### 3.4.7. Determinação do proteinograma sérico

As proteínas totais séricas foram determinadas pela reação de Biureto e avaliadas por método colorimétrico (LABETEST - PROTI A/G, Labtest Diagnóstica Ltda, Lagoa Santa – MG). A separação das proteínas séricas foi realizada segundo a técnica de eletroforese em gel de agarose, de acordo com o kit – CELMGEL (CELM, Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri – SP). O fracionamento eletroforético em gel de agarose, utilizando-se uma amostra de 0,6  $\mu$ L de soro sangüíneo, foi conduzido em cuba horizontal contendo tampão *tris* de pH 9,5 (CELM, Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri – SP). Após 30 minutos de corrida a 90 volts o filme de agarose foi corado com solução de amido *black* 0,2% (Amido Black 10-B, CELM, Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri – SP), durante 5 minutos, em seguida retirado o excesso de corante em solução de ácido acético a 5%, até que o fundo tornou-se transparente, tendo sido então submetido à temperatura de 60°C até secagem completa. A leitura das frações foi realizada por densitometria em 520 nm (Densitômetro Digital DS 35 – CELM, Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri – SP) e analisadas pelo Software para densitômetro por Scanner SDS 60. Determinou-se, assim, o traçado eletroforético e os valores absolutos e relativos das

frações protéicas. As bandas foram divididas em albumina,  $\alpha$ 1-globulina,  $\alpha$ 2-globulina,  $\beta$ 1-globulina,  $\beta$ 2-globulina e  $\gamma$ -globulina.

### 3.5. Análise estatística

Os dados foram analisados como dois quadrados latinos 4 x 4 balanceados, com quatro tratamentos (dietas), quatro animais e quatro períodos cada um, totalizando oito repetições por tratamento. Estes foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (General Linear Models) do software Statistical Analysis System (Versão 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Quando diferenças significativas foram detectadas pelo teste F da ANOVA, comparações múltiplas foram conduzidas pelo Teste de Tukey. Procedeu-se, também, análise por contrastes ortogonais para se avaliar o efeito da parede celular de levedura seca, independentemente de seu nível de inclusão na dieta, comparando-se as médias obtidas para as variáveis da dieta T-0 versus aquelas dos demais tratamentos (T-15, T-30, T-45). As médias também foram submetidas à análise de regressão polinomial para determinar os efeitos lineares ou quadráticos da adição de parede celular de levedura seca na dieta de cães. Todas as variáveis foram inicialmente testadas para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal. Adotou-se como significante  $p < 0,10$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e qualidade fecal

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 9. Os valores de energia bruta (EB), energia metabolizável (EM) e coeficientes de metabolização da energia bruta (CMEB) estão na Tabela 10.

O consumo das dietas experimentais foi bom, não havendo episódios de diarreia, vômitos ou recusa em se alimentar durante o ensaio. As ingestões de nutrientes foram semelhantes para os diferentes tratamentos, as variações verificadas não foram suficientes para interferir nos resultados de digestibilidade. Os dados de consumo de matéria seca e energia bruta demonstram, também, que não houve interferência da parede celular de levedura na palatabilidade das dietas.

Não foi observado efeito do ingrediente teste sobre a digestibilidade da MS, PB, EEA, MO, ENN e EB ( $p>0,1$ ). Já o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria mineral reduziu-se linearmente com a adição de PCL ( $p=0,0005$ ).

As dietas apresentaram os mesmos coeficientes de metabolização da energia bruta, indicando ausência de efeitos da PCL na utilização da energia consumida ( $P>0,1$ ), o que concorda com os resultados de digestibilidade da energia. Desta forma, diferenças encontradas no teor de energia metabolizável dos alimentos, em kcal/kg, são na verdade reflexo das pequenas variações na energia bruta dos alimentos.

As medidas de qualidade e quantidade de fezes e produção urinária estão apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 9.** Consumo de nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente das dietas experimentais com diferentes níveis de inclusões de parede celular de levedura para cães

| Item   | Dietas <sup>1</sup> |                    |                     |                     | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|--|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|  | T-0                 | T-15               | T-30                | T-45                |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
| Peso corporal dos cães (kg)                  | 11,42               | 11,30              | 12,05               | 11,32               | 0,20             | 4,91   | 0,6307     | 0,1660     | 0,5829                 |
| <b>Ingestão de nutrientes (g/animal/dia)</b> |                     |                    |                     |                     |                  |        |            |            |                        |
| Matéria seca                                 | 174,03              | 179,02             | 174,79              | 173,94              | 2,05             | 3,31   | 0,6299     | 0,1718     | 0,4367                 |
| Matéria orgânica                             | 160,62              | 165,31             | 161,90              | 159,61              | 1,89             | 3,29   | 0,4541     | 0,0804     | 0,4577                 |
| Matéria mineral                              | 13,40 <sup>ab</sup> | 13,71 <sup>a</sup> | 12,88 <sup>bc</sup> | 12,68 <sup>c</sup>  | 0,18             | 3,76   | 0,0013     | 0,1603     | 0,1438                 |
| Proteína bruta                               | 59,31 <sup>a</sup>  | 59,30 <sup>a</sup> | 56,15 <sup>b</sup>  | 57,00 <sup>ab</sup> | 0,77             | 3,75   | 0,0089     | 0,5843     | 0,0546                 |
| Extrato etéreo ácido                         | 27,35 <sup>ab</sup> | 25,72 <sup>c</sup> | 27,45 <sup>a</sup>  | 26,13 <sup>bc</sup> | 0,30             | 3,22   | 0,1746     | 0,6210     | 0,0182                 |
| Fibra bruta                                  | 3,94 <sup>b</sup>   | 4,58 <sup>a</sup>  | 4,71 <sup>a</sup>   | 3,98 <sup>b</sup>   | 0,05             | 3,14   | 0,0119     | 0,0057     | 0,0002                 |
| Extrativos não nitrogenados                  | 70,01 <sup>a</sup>  | 75,69 <sup>b</sup> | 73,58 <sup>b</sup>  | 74,13 <sup>b</sup>  | 0,82             | 3,16   | 0,2898     | <0,0001    | <0,0001                |
| Parede celular de levedura                   | 0,00 <sup>d</sup>   | 0,26 <sup>c</sup>  | 0,52 <sup>b</sup>   | 0,78 <sup>a</sup>   | 0,03             | 22,56  | <0,0001    | 0,8909     | <0,0001                |
| Energia Bruta (kcal/animal/dia)              | 879,11              | 890,08             | 883,92              | 867,72              | 10,16            | 3,26   | 0,3861     | 0,1975     | 0,9021                 |
| <b>Coeficiente de digestibilidade</b>        |                     |                    |                     |                     |                  |        |            |            |                        |
| Matéria seca                                 | 86,10               | 86,71              | 85,82               | 86,71               | 0,77             | 2,54   | 0,8007     | 0,8349     | 0,9027                 |
| Matéria orgânica                             | 90,90               | 90,68              | 90,41               | 90,69               | 1,12             | 0,36   | 0,7784     | 0,9509     | 0,9842                 |
| Matéria mineral                              | 42,58 <sup>a</sup>  | 32,12 <sup>b</sup> | 28,05 <sup>b</sup>  | 27,79 <sup>b</sup>  | 22,28            | 2,57   | 0,0005     | 0,0625     | 0,0003                 |
| Proteína bruta                               | 88,59               | 88,46              | 87,60               | 88,02               | 0,51             | 1,62   | 0,2690     | 0,5957     | 0,3464                 |
| Extrato etéreo ácido                         | 93,11               | 92,87              | 93,24               | 92,96               | 0,33             | 1,01   | 0,9631     | 0,9441     | 0,8329                 |
| Fibra bruta                                  | 57,52               | 64,01              | 63,31               | 57,09               | 10,54            | 2,25   | 0,8461     | 0,0115     | 0,1474                 |
| Extrativos não nitrogenados                  | 93,19               | 93,78              | 93,24               | 93,75               | 0,58             | 0,19   | 0,2104     | 0,8371     | 0,0944                 |
| Energia Bruta                                | 91,63               | 91,09              | 90,67               | 90,93               | 0,54             | 1,67   | 0,3153     | 0,4653     | 0,2566                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

a, b, c, d - médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes (p<0,1).

**Tabela 10.** Valores da energia bruta (EB), energia metabolizável (EM) e coeficientes de metabolização da energia bruta (CMEB) das dietas experimentais com diferentes inclusões de parede celular de levedura para cães

| Item     | Dietas <sup>1</sup>  |                      |                       |                       | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|----------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|          | Controle             | T-15                 | T-30                  | T-45                  |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
|          | (Kcal/Kg de MS)      |                      |                       |                       |                  |        |            |            |                        |
| EB       | 5051,62              | 4971,64              | 5057,06               | 4988,49               | -                | -      | -          | -          | -                      |
| EM       | 4411,30 <sup>a</sup> | 4287,47 <sup>b</sup> | 4361,67 <sup>ab</sup> | 4305,03 <sup>ab</sup> | 30,10            | 1,96   | 0,0859     | 0,2791     | 0,0152                 |
| CMEB (%) | 87,32                | 86,23                | 86,25                 | 86,29                 | 0,60             | 1,95   | 0,2655     | 0,3536     | 0,1403                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

<sup>a, b</sup> – médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes (p<0,1).



**Tabela 11.** Variáveis fecais e urinárias em cães mediante o consumo das dietas experimentais com parede celular de levedura

| Item                     | Dietas <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|--------------------------|---------------------|--------|--------|--------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|                          | T-0                 | T-15   | T-30   | T-45   |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
| pH fecal                 | 6,69                | 6,77   | 6,78   | 6,83   | 0,05             | 1,94   | 0,0573     | 0,7709     | 0,0746                 |
| Escore fecal             | 4,00                | 3,91   | 3,92   | 4,00   | 0,04             | 2,84   | 0,9448     | 0,0562     | 0,2539                 |
| g fezes MN cão/dia       | 59,27               | 61,60  | 64,23  | 60,38  | 1,78             | 8,18   | 0,4641     | 0,0992     | 0,1896                 |
| MS fecal (%)             | 39,31               | 39,84  | 38,84  | 39,15  | 0,42             | 3,05   | 0,4506     | 0,8015     | 0,9511                 |
| g fezes MS cão/dia       | 23,30               | 24,40  | 24,89  | 23,74  | 0,69             | 8,13   | 0,5643     | 0,1226     | 0,2082                 |
| g fezes MN/kg/dia        | 5,01                | 5,15   | 5,42   | 6,32   | 0,38             | 19,36  | 0,0212     | 0,2948     | 0,1783                 |
| g fezes MS/kg/dia        | 1,97                | 2,04   | 2,10   | 2,00   | 0,06             | 8,64   | 0,5832     | 0,2489     | 0,3353                 |
| g fezes MN/100g de ração | 32,72               | 31,27  | 33,52  | 32,73  | 1,33             | 11,53  | 0,7058     | 0,8051     | 0,8896                 |
| g fezes MS/100g de ração | 13,89               | 13,59  | 14,18  | 13,89  | 0,53             | 10,86  | 0,8119     | 0,9880     | 0,9910                 |
| mL urina cão/dia         | 292,61              | 253,69 | 332,42 | 307,26 | 2,86             | 37,38  | 0,4929     | 0,8626     | 0,9101                 |
| mL urina/kg/dia          | 23,24               | 20,70  | 26,22  | 24,60  | 39,19            | 34,10  | 0,4488     | 0,8730     | 0,8438                 |

<sup>1</sup>- T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup>- erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup>- contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

Dentre as variáveis fecais estudadas, verificou-se aumento linear no pH das fezes ( $P<0,057$ ), demonstrando também o contraste ortogonal maior pH nas fezes dos cães que receberam PCL em relação aos que não receberam ( $P<0,074$ ). A produção de fezes, em g de matéria natural por quilograma de animal por dia aumentou de forma linear com a suplementação de PCL ( $P<0,021$ ), indicando retenção de água no bolo fecal. Esta, no entanto, não interferiu de forma importante no escore das fezes e não alterou a matéria seca fecal ( $P<0,1$ ).

#### **4.2. Composição microbiológica das fezes**

Os efeitos da inclusão de concentrações crescentes de PCL sobre a população bacteriana das fezes dos cães estão apresentados na Tabela 12. Não foi observada variação entre os tratamentos quanto às contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) de aeróbios e anaeróbios totais, *Escherichia coli*, *Clostridium spp*, *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* ( $P>0,1$ ). Todas as amostras de fezes se mostraram negativas quanto à presença de *Salmonella spp*.

#### **4.3. Concentração fecal dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de aminas bioativas**

A concentração de ácido butírico aumentou linearmente nas fezes com a inclusão de PCL à dieta ( $P=0,055$ ), permanecendo inalteradas as concentrações fecais de ácidos acético, propiônico e láctico ( $P>0,1$ ). A concentração de AGCC Totais também não apresentou alteração entre os tratamentos. Estes dados encontram-se na Tabela 13.

A concentração de aminas bioativas nas fezes foi influenciada pelo consumo de parede celular de levedura. Houve redução linear das concentrações fecais de tiramina ( $P=0,102$ ) e histamina ( $P=0,079$ ), e redução quadrática das concentrações de feniletilamina ( $P=0,070$ ) e triptamina ( $P=0,071$ ), como pode ser visto na Tabela 14.

**Tabela 12.** Contagem de bactérias nas fezes de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura

| Item                       | Dietas <sup>1</sup>               |      |      |      | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|----------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|                            | Controle                          | T-15 | T-30 | T-45 |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
|                            | (Log UFC/g fezes na matéria seca) |      |      |      |                  |        |            |            |                        |
| Aeróbios totais            | 1,96                              | 1,98 | 1,99 | 1,79 | 0,11             | 15,82  | 0,3154     | 0,3394     | 0,7427                 |
| Anaeróbios totais          | 2,01                              | 1,99 | 1,93 | 1,91 | 0,26             | 16,09  | 0,4995     | 0,9824     | 0,6390                 |
| <i>Escherichia coli</i>    | 1,66                              | 1,62 | 1,72 | 1,54 | 0,14             | 23,50  | 0,6802     | 0,6133     | 0,8385                 |
| <i>Clostridium</i> spp     | 0,85                              | 0,94 | 0,80 | 0,84 | 0,08             | 26,12  | 0,6174     | 0,7634     | 0,9324                 |
| <i>Lactobacillus</i> spp   | 1,92                              | 1,86 | 1,81 | 1,82 | 0,15             | 23,36  | 0,6161     | 0,7972     | 0,6015                 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp | 2,08                              | 2,00 | 1,90 | 1,98 | 0,11             | 15,41  | 0,4031     | 0,4611     | 0,3373                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

**Tabela 13.** Concentração de ácidos graxos de cadeia curta das fezes dos cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura

| Item                     | Dietas <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|--------------------------|---------------------|--------|--------|--------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|                          | Controle            | T-15   | T-30   | T-45   |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
|                          | (mMol/Kg de MS)     |        |        |        |                  |        |            |            |                        |
| Ácido Acético            | 314,05              | 332,69 | 367,67 | 328,81 | 25,50            | 21,47  | 0,4958     | 0,2743     | 0,3376                 |
| Ácido Propiônico         | 133,26              | 130,57 | 145,24 | 129,25 | 10,51            | 22,09  | 0,9557     | 0,5351     | 0,8864                 |
| Ácido Butírico           | 42,18               | 42,93  | 53,45  | 52,38  | 4,50             | 26,65  | 0,0558     | 0,8413     | 0,1708                 |
| AGCC <sup>4</sup> Totais | 489,49              | 506,18 | 566,36 | 510,44 | 37,68            | 20,56  | 0,4746     | 0,3480     | 0,3918                 |
| Ácido Láctico            | 32,81               | 34,15  | 32,61  | 33,98  | 3,30             | 27,94  | 0,8958     | 0,9978     | 0,8418                 |

<sup>1</sup>- T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup>- erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup>- contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

<sup>4</sup>- AGCC = ácidos graxos de cadeia curta.

**Tabela 14.** Concentrações de aminas bioativas nas fezes de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura

| Item             | Dietas <sup>1</sup>                    |                   |                   |                    | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|------------------|--|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|                  | T-0                                    | T-15              | T-30              | T-45               |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
|                  | (mg/100g de fezes na matéria original) |                   |                   |                    |                  |        |            |            |                        |
| Putrescina       | 8,63                                   | 9,57              | 8,32              | 9,54               | 0,91             | 28,44  | 0,7160     | 0,8785     | 0,6269                 |
| Cadaverina       | 2,52                                   | 2,80              | 1,95              | 2,49               | 0,34             | 39,84  | 0,5474     | 0,7166     | 0,7922                 |
| Tiramina         | 0,94 <sup>ab</sup>                     | 1,40 <sup>a</sup> | 0,58 <sup>b</sup> | 0,83 <sup>ab</sup> | 0,15             | 44,62  | 0,1028     | 0,4859     | 0,9981                 |
| Histamina (n=6)  | 0,19                                   | 0,20              | 0,09              | 0,11               | 0,03             | 53,01  | 0,0799     | 0,5839     | 0,4073                 |
| Agmatina (n=7)   | 0,20                                   | 0,22              | 0,20              | 0,10               | 0,06             | 85,44  | 0,1225     | 0,2950     | 0,5757                 |
| Espermidina      | 4,76                                   | 5,76              | 9,03              | 5,10               | 2,09             | 95,71  | 0,6524     | 0,2534     | 0,4491                 |
| Espermina        | 9,23                                   | 7,69              | 10,86             | 10,73              | 1,93             | 56,54  | 0,3853     | 0,7190     | 0,8151                 |
| Feniletilamina   | 0,63                                   | 0,96              | 0,67              | 0,57               | 0,11             | 44,48  | 0,3622     | 0,0704     | 0,4333                 |
| Triptamina (n=6) | 0,56                                   | 0,81              | 0,53              | 0,45               | 0,08             | 36,07  | 0,5424     | 0,0716     | 0,2756                 |
| Aminas Totais    | 27,45                                  | 29,12             | 32,09             | 29,79              | 3,72             | 35,55  | 0,5553     | 0,6004     | 0,5104                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

<sup>a, b</sup> – médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes (p<0,1).

#### **4.4. Hemograma e determinações bioquímicas**

Os parâmetros eritroleucométricos e plaquetários dos cães mediante consumo das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 15. Os resultados da atividade enzimática e valores bioquímicos estão apresentados na Tabela 16. As concentrações séricas de proteínas totais e creatinina apresentaram redução linear com a inclusão de PCL na dieta ( $p < 0.1$ ). No entanto, suas concentrações apresentaram-se dentro dos valores de referência preconizados por KANEKO et al. (1997) e não sugerem alteração clinicamente significativa. Os demais parâmetros bioquímicos e eritroleucométricos não apresentaram alteração ( $P > 0.1$ ).

#### **4.5. Imunofenotipagem de linfócitos**

Os resultados da imunofenotipagem dos linfócitos estão apresentados na Tabela 17.

Observou-se aumento linear na concentração sanguínea de  $CD5^+$  ( $P = 0.1$ ) e, na avaliação do contraste ortogonal, maior concentração de  $CD45^+CD21^+$  após consumo de PCL ( $P = 0.053$ ).

#### **4.6. Determinação do proteinograma sérico**

Os parâmetros protéicos séricos de cães mediante consumo das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 18.

Foi observado efeito do consumo de PCL sobre o perfil eletroforético das frações séricas de albumina,  $\alpha 1$ -globulina e  $\beta$ -globulina de cães, com redução linear destas frações com o aumento do consumo de PCL ( $P < 0.1$ ). O índice de proporção albumina globulinas (A/G) apresentou-se dentro dos valores normais descritos para cães segundo KANEKO et al. (1997), em todas as condições estudadas.

**Tabela 15.** Hemograma de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura. Parâmetros eritroleucométricos e plaquetários em valores absolutos

| Item   | Dietas <sup>1</sup> |         |         |         | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|--|---------------------|---------|---------|---------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|  | T-0                 | T-15    | T-30    | T-45    |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
| Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )                | 6,88                | 6,92    | 6,81    | 6,77    | 0,19             | 7,95   | 0,6115     | 0,8377     | 0,8361                 |
| Leucócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )              | 8,05                | 8,03    | 8,95    | 8,33    | 0,79             | 27,00  | 0,6244     | 0,7109     | 0,6753                 |
| Hemoglobina (g/dL)                             | 15,85               | 16,02   | 15,83   | 15,61   | 0,44             | 7,81   | 0,6511     | 0,6531     | 0,9611                 |
| Hematócrito (%)                                | 47,53               | 47,06   | 47,56   | 46,12   | 1,34             | 8,07   | 0,5419     | 0,7245     | 0,6939                 |
| Basófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )               | 0                   | 0       | 0       | 0       | 0                | 0      | -          | -          | -                      |
| Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )             | 281,90              | 285,40  | 293,40  | 312,80  | 85,11            | 82,06  | 0,3967     | 0,4500     | 0,7502                 |
| Neutrófilos bastonetes ( $10^3/\mu\text{L}$ )  | 170,13              | 155,80  | 147,50  | 212,25  | 38,22            | 63,06  | 0,5968     | 0,6801     | 0,6520                 |
| Neutrófilos segmentados ( $10^3/\mu\text{L}$ ) | 5717,80             | 5699,50 | 6373,00 | 5914,80 | 524,96           | 25,05  | 0,5968     | 0,6801     | 0,6520                 |
| Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )              | 1585,80             | 1510,10 | 1623,90 | 1525,80 | 243,10           | 44,03  | 0,9521     | 0,9636     | 0,9091                 |
| Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )               | 347,60              | 386,60  | 522,90  | 407,00  | 94,65            | 64,34  | 0,4672     | 0,4240     | 0,4149                 |
| Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )               | 304,12              | 281,12  | 290,75  | 270,87  | 275,03           | 27,13  | 0,4732     | 0,9553     | 0,4743                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

**Tabela 16.** Atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e concentrações séricas de uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, triglicérides e colesterol de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura

| Item                    | Dietas <sup>1</sup> |                   |                    |                   | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|-------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|                         | T-0                 | T-15              | T-30               | T-45              |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
| ALT (U/L)               | 38,33               | 38,49             | 32,12              | 39,89             | 2,92             | 22,16  | 0,8988     | 0,2089     | 0,6629                 |
| FA (U/L)                | 70,48               | 75,67             | 78,78              | 85,00             | 7,09             | 25,88  | 0,1585     | 0,9427     | 0,2694                 |
| Creatinina (mg/dL)      | 0,71                | 0,68              | 0,66               | 0,60              | 0,04             | 15,72  | 0,0425     | 0,6430     | 0,1568                 |
| Uréia (mg/dL)           | 26,39               | 28,22             | 26,58              | 26,63             | 1,56             | 16,35  | 0,8941     | 0,5753     | 0,6827                 |
| Triglicérides (mg/dL)   | 68,10               | 79,55             | 77,83              | 82,16             | 10,01            | 36,81  | 0,3782     | 0,7260     | 0,3230                 |
| Colesterol (mg/dL)      | 202,77              | 216,60            | 240,93             | 219,37            | 11,76            | 15,11  | 0,1756     | 0,1496     | 0,1094                 |
| Proteínas totais (g/dL) | 7,23 <sup>ab</sup>  | 7,31 <sup>a</sup> | 6,77 <sup>ab</sup> | 6,28 <sup>b</sup> | 0,24             | 10,02  | 0,0060     | 0,2561     | 0,1322                 |
| Albumina (g/dL)         | 2,92                | 2,81              | 2,98               | 2,95              | 0,13             | 12,71  | 0,6478     | 0,7639     | 0,9870                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45

<sup>a, b</sup> – médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes (p<0,1)



**Tabela 17.** Subpopulações linfocitárias sanguíneas de cães mediante consumo de dietas com diferentes inclusões de parede celular de levedura

| Item                                | Dietas <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | CV (%) | Contrastes |            |                        |
|-------------------------------------|---------------------|--------|--------|--------|------------------|--------|------------|------------|------------------------|
|                                     | T-0                 | T-15   | T-30   | T-45   |                  |        | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
|                                     | (céls/μL)           |        |        |        |                  |        |            |            |                        |
| CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>   | 377,43              | 340,19 | 421,59 | 431,91 | 56,36            | 40,58  | 0,3442     | 0,6781     | 0,7567                 |
| CD5 <sup>+</sup>                    | 630,90              | 647,80 | 823,20 | 806,70 | 90,62            | 35,25  | 0,1000     | 0,8558     | 0,2359                 |
| CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>   | 129,24              | 151,56 | 180,03 | 150,13 | 19,03            | 35,24  | 0,2985     | 0,1869     | 0,1711                 |
| CD21 <sup>+</sup>                   | 782,20              | 796,80 | 799,90 | 765,40 | 112,43           | 40,45  | 0,9258     | 0,8295     | 0,9689                 |
| CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> | 68,01               | 160,71 | 167,34 | 138,08 | 36,62            | 77,57  | 0,2022     | 0,1132     | 0,0536                 |

<sup>1</sup>- T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup>- erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup>- contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

**Tabela 18.** Concentrações séricas de proteínas totais e suas frações albumina,  $\alpha_1$ -globulina;  $\alpha_2$ -globulina;  $\beta$ -globulina e  $\gamma$ -globulina de cães mediante consumo das dietas experimentais com parede celular de levedura

| Item                  | Dietas <sup>1</sup> |                   |                    |                   | EPM <sup>2</sup> | CV<br>(%) | Contrastes |            |                        |
|-----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------|------------|------------|------------------------|
|                       | T-0                 | T-15              | T-30               | T-45              |                  |           | Linear     | Quadrático | Ortogonal <sup>3</sup> |
|                       | (g/dL)              |                   |                    |                   |                  |           |            |            |                        |
| Proteínas Totais      | 7,23 <sup>ab</sup>  | 7,31 <sup>a</sup> | 6,77 <sup>ab</sup> | 6,28 <sup>b</sup> | 0,24             | 10,02     | 0,0060     | 0,2561     | 0,1322                 |
| Albumina              | 3,12                | 3,04              | 2,52               | 2,60              | 0,20             | 20,31     | 0,0350     | 0,6847     | 0,1044                 |
| $\alpha_1$ -globulina | 0,95                | 0,97              | 0,88               | 0,79              | 0,05             | 14,12     | 0,0117     | 0,2438     | 0,2035                 |
| $\alpha_2$ -globulina | 0,65                | 0,70              | 0,65               | 0,58              | 0,04             | 17,14     | 0,1584     | 0,1425     | 0,8987                 |
| $\beta$ -globulina    | 1,55 <sup>ab</sup>  | 1,60 <sup>a</sup> | 1,50 <sup>ab</sup> | 1,27 <sup>b</sup> | 0,08             | 15,60     | 0,0197     | 0,1105     | 0,3326                 |
| $\gamma$ -globulina   | 0,95                | 1,00              | 0,84               | 0,90              | 0,05             | 15,15     | 0,1720     | 0,9010     | 0,5020                 |
| A/G                   | 0,76                | 0,73              | 0,76               | 0,71              | 0,03             | 12,89     | 0,4774     | 0,8844     | 0,4785                 |

<sup>1</sup> - T-0 – dieta controle, com 0% de PCL; T-15 – 0,15% de PCL; T-30 – 0,30% de PCL; T-45 – 0,45% de PCL.

<sup>2</sup> - erro padrão da média, n=8 por dieta.

<sup>3</sup> - contraste ortogonal – T0 versus T-15 + T-30 + T-45.

<sup>a, b</sup> – médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes (p<0,1).

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o propósito de avaliar as possíveis influências da adição de parede celular de levedura ao alimento sobre a função imunológica, variáveis hematológicas, digestibilidade dos nutrientes, população microbiana fecal e subprodutos da fermentação bacteriana no trato gastrointestinal de cães saudáveis. De maneira geral, a literatura disponível atribui a PCL a capacidade de alteração benéfica da microbiota intestinal e/ou de sua atividade metabólica (ZENTEK et al., 2002) e diminuição na produção de subprodutos da fermentação protéica (FLICKINGER et al., 2003). Além disso, existem relatos de efeito imunomodulatório deste prebiótico, como descrito por SWANSON & FAHEY (2007).

O consumo de MS, MO e energia não variou entre os tratamentos. Embora a ingestão de PB, EEA, MM e FB tenha variado, as diferenças entre tratamentos foram pequenas e provavelmente não interferiram nos resultados de digestibilidade (Tabela 9). Observou-se ausência de efeito da PCL sobre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da MS, PB, EEA, MO, ENN e EB ( $p>0,1$ ). Estes achados concordam com os encontrados por STRICKLING et al. (2000) para MS e nitrogênio, ao adicionarem 5g MOS por kg de dieta para cães, e por SWANSON et al. (2002), que também não observaram alteração nos CDA em trato digestório total dos nutrientes em cães suplementados com MOS. Porém, neste mesmo experimento SWANSON et al. (2002) constataram tendência à diminuição do coeficiente de digestibilidade ileal da MS e MO e redução da digestibilidade da PB. Os autores atribuíram este fato a uma possível ligação ou aglutinação da proteína com um componente da PCL, o mananoligossacarídeo, tornando-a menos digestível devido à provável formação de barreira física.

ZENTEK et al. (2002) observaram diminuição no CDA da PB, ENN e MS em cães suplementados com 1 grama de MOS por quilograma de peso corporal por dia durante 10 dias. FLICKINGER et al. (2003), avaliando outro prébiótico para cães, a oligofrutose, também encontraram redução do CDA da MS, MO e EE, além de tendência à redução do CDA da PB. Estes achados foram atribuídos pelos autores à

diminuição no tempo de trânsito intestinal, efeito comum de fibras fermentáveis, e ao aumento da síntese celular bacteriana, com conseqüente aumento da biomassa microbiana das fezes, com aumento da excreção fecal de nitrogênio.

No presente estudo observou-se redução linear do CDA da matéria mineral com a adição de PCL, contradizendo o demonstrado por ZENTEK et al. (2002), que não observaram variação na absorção aparente do cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio. Esta redução não encontra explicação na produção de fezes, pois foi semelhante entre tratamentos. Talvez a elevação do pH no tubo digestivo, demonstrado pelo aumento linear do pH das fezes, possa explicar a diminuição da digestibilidade da MM aqui verificada. As dietas apresentaram os mesmos coeficientes de metabolização da energia bruta (Tabela 10), sugerindo que a PCL não interferiu na utilização da energia consumida ( $P>0,1$ ). Diferenças encontradas no teor de energia metabolizável dos alimentos, em kcal/kg, são na verdade reflexo das pequenas variações na energia bruta das dietas.

A inclusão de PCL levou ao aumento linear no pH das fezes ( $P=0,057$ ), demonstrando também o contraste ortogonal, maior pH das fezes dos cães que receberam PCL em relação aos que não receberam ( $P=0,074$ ). Fato semelhante foi encontrado por SWANSON et al. (2002), que justificaram este aumento de pH pela rápida absorção dos AGCC no cólon. Este fato pode se justificar, também, por não ter havido no presente experimento aumento da concentração de lactato nas fezes.

A produção de fezes, em gramas de matéria natural por quilograma de peso corporal por dia aumentou de forma linear com a suplementação de PCL, indicando retenção de água no bolo fecal. Esta, no entanto, foi pequena, não interferindo no escore das fezes e na matéria seca fecal. Estes achados estão em contradição ao verificado nos estudos de STRICKLING et al. (2000), SWANSON et al. (2002) e ZENTEK et al. (2002), que não encontraram alteração na produção fecal. De qualquer forma, este é um aspecto a ser considerado, pois suplementações maiores podem vir a alterar a formação de fezes.

Dentro das doses testadas, a adição de PCL não resultou em alterações nas contagens de unidades formadoras de colônias de aeróbios e anaeróbios totais,

*Escherichia coli*, *Clostridium* spp, *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp nas fezes dos cães. Diferentemente do encontrado na presente pesquisa, SWANSON et al. (2002) verificaram redução de aeróbios totais em uma unidade logarítmica e tendência à maior concentração de lactobacilos nas fezes de cães. Esta alteração foi conseguida mediante consumo de aproximadamente 45mg de MOS por kg de peso corporal, valor até inferior ao observado na presente pesquisa no tratamento T-45, de 54mg de PCL por kg de peso corporal por dia. Deve-se considerar, no entanto, que diminuição de aeróbios é um resultado relativamente inespecífico em relação ao equilíbrio da microbiota entérica.

STRICKLING et al. (2000) encontraram diminuição na população fecal de *Clostridium perfringens* de cães suplementados com MOS quando comparados com cães suplementados com xiloligossacarídeo (XOS) e FOS (5g/kg dieta). No entanto, as contagens foram semelhantes entre os suplementados com MOS e o grupo controle para os gêneros pesquisados (*C. perfringens*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Coliformes* e anaeróbios aerotolerantes), achado semelhante ao do presente estudo. Segundo estes autores, a dieta é o fator mais importante para o controle da atividade microbiana no trato gastrointestinal de não ruminantes. A digesta que chega ao intestino grosso vai definir a população microbiana pela quantidade e tipo de substrato que fornece. Estes discutem que a inclusão de 0,5% de prebióticos à dieta de cães talvez seja insuficiente, com reduzidos benefícios. A dieta por eles empregada apresentava mescla de proteína de origem animal e vegetal, o que levou os autores a sugerirem a necessidade de estudos com dietas à base de proteína animal, devido à sua relação com o crescimento de *Clostridium perfringens* no intestino grosso. ZENTEK et al. (2003), demonstraram que o consumo de proteínas de origem animal favorece o crescimento de bactérias indesejáveis, como o *Clostridium perfringens* e reduz as contagens fecais de bifidobactérias. Na presente pesquisa, no entanto, a despeito das dietas terem elevadas concentrações protéicas (33%) e esta de origem animal (farinha de vísceras de frango), também não foram evidenciados efeitos da PCL na população microbiana das fezes.

Variações na composição química da PCL empregada podem interferir,

também, nos resultados obtidos. O prebiótico utilizado nos demais estudos foi de um mesmo fabricante e sua composição química não foi divulgada. Este produto é comercializado como fonte concentrada de mananoligossacarídeo derivada de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Considerando apenas estas informações disponíveis, talvez a elevada concentração de  $\beta$ -glucano (30% da PCL) no produto aqui testado seja um ponto importante quanto a seus efeitos verificados nos cães. Em muitos estudos a fonte de mananoligossacarídeo empregado e sua composição química não são adequadamente apresentadas, o que prejudica a interpretação dos resultados.

De qualquer forma, verifica-se que os resultados da PCL sobre a composição da microbiota fecal de cães são controversos e, com base nos dados disponíveis, de pequena magnitude. A composição da PCL em mananoligossacárides, a disponibilidade deste açúcar para fermentação microbiana, a dose empregada e sua interação com a composição e digestibilidade da dieta como um todo são fatores importantes e ainda não totalmente esclarecidos para cães.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, dos AGCC estudados apenas o butirato apresentou aumento linear com a inclusão de PCL. Estes resultados diferem dos observados por ZENTEK et al. (2002) e SWANSON et al. (2002), que não encontraram nenhuma diferença quanto aos AGCC. STRICKLING et al. (2000), por outro lado, verificaram menor concentração de butirato no conteúdo ileal de cães suplementados com MOS.

A capacidade metabólica das bactérias intestinais pode ser extremamente diversa, independentemente da composição microbiana intestinal. Qualquer composto ingerido ou substância que entra no intestino através do trato biliar, sangue ou diretamente por secreção no lúmen, é um substrato em potencial para fermentação ou transformação bacteriana (TESHIMA, 2003). Embora não se conheça bem a atividade enzimática na maioria dos grupos bacterianos intestinais, acredita-se que a degradação de materiais altamente polimerizados neste órgão seja uma atividade cooperativa com a participação de vários grupos bacterianos. Os principais gêneros envolvidos na degradação dos poli e oligossacarídeos são os *Bacterioides* e *Bifidobacterium*.

Espécies proteolíticas, que incluem os gêneros *Clostridium* (KAMRA, 2005), *Enterobacteriaceae* e algumas espécies de *Eubacterium* (TESHIMA, 2003), produzem compostos tóxicos (aminas biogênicas, amônia, fenóis, etc), ao passo que os ácidos graxos de cadeia curta, oriundos do metabolismo de espécies sacarolíticas como *Bacterioides*, *Bifidobacterium* (TESHIMA, 2003), bactérias lácticas e *Eubacterium* (VANHOUTTE et al. 2005), são importantes por aumentar a produção de energia para o intestino, contribuir positivamente na digestão e metabolismo do hospedeiro, além de atenuar os efeitos nocivos dos produtos gerados pela degradação das proteínas. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os produtos intermediários e finais da fermentação realizada pela microbiota dependem da composição química dos carboidratos disponíveis. Assim, a fermentação do amido produz elevada quantidade de butirato, enquanto que substratos mais oxidados, como a pectina, produzem maior quantidade de acetato. Outros fatores que podem contribuir para a utilização de polissacarídeos pela microbiota incluem a solubilidade do polissacarídeo em água, o tipo de processo submetido ao alimento e o tamanho da partícula que chega ao intestino (TESHIMA, 2003).

Existem poucas informações sobre a real capacidade da microbiota intestinal de cães fermentar a PCL. Em estudo recente, CALABRÒ et al. (2008), avaliaram a fermentação de 11 substratos incubados em inóculo fecal de cão, incluído amostra da PCL empregada no presente estudo. Observaram que a PCL demonstrou, após 48h de incubação 99% de desaparecimento da matéria orgânica, valor semelhante ao de outros prébióticos avaliados (inulina e FOS). Em relação à produção de AGCC, os autores verificaram que apesar desta ser mais lenta (mL/h), a produção total em mmol/g foi semelhante entre os três prebióticos avaliados. Desta forma, demonstraram que a PCL é efetivamente fermentada pelas bactérias intestinais de cães, justificando no presente estudo os achados referentes ao aumento de butirato.

Sabe-se que, dentre os AGCC o butirato se destaca por sua contribuição para a manutenção da integridade do cólon. Parece haver preferência dos colonócitos para o metabolismo de butirato, que contribui diretamente para a produção de energia (SWANSON & FAHEY, 2007). O suprimento de butirato ajuda, ainda, a manter a

integridade da mucosa, desempenhando importante papel na manutenção de um fenótipo celular normal e redução do risco de carcinomas em cólon (NRC, 2006). Estes aspectos configuram importante ação da PCL, pois apesar de não terem ocorrido alterações nas populações bacterianas medidas, os produtos finais da fermentação se alteraram benéficamente, podendo resultar em aumento de saúde intestinal e orgânica dos cães.

Durante a fermentação no cólon de aminoácidos endógenos e os não digeridos da dieta, vários compostos putrefativos são formados. Estes são considerados os principais responsáveis pelo mau odor das fezes, incluindo a amônia, aminas, ácidos graxos de cadeia ramificada, indóis, fenóis e compostos sulfurados voláteis. Muitos desses compostos apresentam efeitos adversos ao equilíbrio da microbiota intestinal, estando vários deles relacionados com a tumorigênese (SWANSON et al., 2002).

Das dez aminas bioativas estudadas no presente estudo, verificou-se redução de quatro delas (tiramina, histamina, feniletilamina e triptamina) nas fezes dos cães com a adição de PCL à dieta. De maneira oposta ao encontrado nesta pesquisa, tendência ao aumento de tiramina foi encontrado por SWANSON et al. (2002) como resultado da adição de FOS (1g/cão/dia), mas não de MOS à dieta, que não influenciou em nenhuma das aminas bioativas estudadas. Segundo CUMMINGS et al. (1979) carboidratos fermentáveis podem diminuir a concentração de compostos putrefativos por fornecerem à microbiota intestinal fonte extra de energia. Na presença de carboidratos como fonte de energia, a proteína não digerida e seus metabólitos são utilizados pelas bactérias para síntese protéica, diminuindo a concentração de compostos da fermentação de proteína nas fezes. Este fato foi corroborado por ZENITEK et al. (2002), que observaram diminuição da excreção fecal de amônia em cães suplementados com MOS.

Estudo com oligofrutose na dieta de cães revelou, a semelhança da presente pesquisa, tendência ao decréscimo da putrescina e cadaverina, sendo esta atribuída, juntamente com a diminuição da concentração de fenóis, ao aumento do número de bifidobactérias e/ou de sua atividade metabólica nas fezes (FLICKINGER et al., 2003). HUSSEIN & SUNVOLD (2000), ao avaliarem a inclusão de FOS (0,25% e 0,50% da



deita) também verificaram redução nas concentrações de tiramina, putrescina e cadaverina nas fezes dos animais alimentados com a dieta com maior inclusão do prebiótico.

Desta forma, verifica-se que os efeitos dos oligossacarídeos na produção de aminas são ainda controversos. Diferenças nas composições nutricionais e de ingredientes das dietas teste, bem como no nível de inclusão e tipo de oligossacarídeo estudado são importantes. A redução da concentração de algumas aminas nas fezes dos cães verificadas pelo consumo de PCL no presente estudo pode ser considerada importante, representando alteração positiva do metabolismo bacteriano intestinal dos cães.

Segundo SHALABY (1996) aminas bioativas são fatores antinutricionais naturais e são hábeis a iniciar várias reações farmacológicas. As feniletilamina e tiramina são vasoconstritoras e causam aumento na pressão sanguínea, ao contrário da histamina que reduz a pressão sanguínea. A histamina possui poderosa ação biológica, servindo como mediador primário de sintomas imediatos notados em respostas alérgicas. As aminas aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) estão envolvidas em vários processos tóxicos (MAFRA et al., 1999). Desta forma, a diminuição da formação intestinal destes compostos pode representar benefício para saúde intestinal e geral de cães, o que mereceria mais estudos.

Os parâmetros eritroleucométricos, plaquetários e de bioquímica sérica permaneceram dentro dos intervalos de referência quando comparados àqueles reportados por FELDMAN et al. (2000) e KANEKO et al.(1997). Segundo REBAR et al.(2003), os achados hematológicos fornecem uma visão instantânea do sistema hematopoiético em um momento específico e oferecem visão geral sobre o estado do paciente. A ausência de alterações nos achados hematológicos no presente estudo indica ser o suplemento seguro nas doses e períodos testados.

Já as concentrações séricas de proteínas totais e creatinina apresentaram diminuição linear com a inclusão de PCL na dieta, porém, ainda assim, estas apresentaram-se dentro dos valores de referência preconizados por KANEKO et al.

(1997) e não indicam alteração clinicamente significativa. Situação semelhante foi encontrada por SWANSON et al. (2002) que também não observaram alteração com a suplementação de MOS para cães. Poucos são os dados sobre o efeito dos prebióticos nos parâmetros sanguíneos de várias espécies, sendo ainda mais restritos os trabalhos relacionando tais variáveis para cães. BUDIÑO et al. (2004) realizaram experimento para testar a influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e variáveis hematológicas, também não encontrando diferença entre os tratamentos.

O aumento das populações de linfócitos pan T e linfócitos B, verificados no presente estudo sugere melhora na resposta imune dos cães. Estudo anterior com cães não havia demonstrado efeito imunoestimulante da PCL. O'CARRA (1997), ao avaliar a inclusão de 1, 2 ou 4 g de MOS por Kg de dieta, não observou variação entre grupos nas concentrações de proteínas plasmáticas e IgG. Em um segundo experimento, O'CARRA (1997) comparou dieta controle com a suplementação de 2g MOS/Kg de peso corporal, sem verificar alteração significativa nos parâmetros avaliados.

Segundo VOGT (2005), este aumento de linfócitos circulantes pode ser decorrente do estímulo causado pela presença de PCL no lúmen intestinal. O mananoligossacarídeo, contido na PCL de *Saccharomyces cerevisiae* foi apontado como capaz de desencadear fortes estímulos antigênicos (BALLOU, 1970). Os mananoligossacarídeos podem, também, estimular a resposta imune contra patógenos específicos impedindo sua colonização no intestino e fazendo com que sejam apresentados ao sistema imune como antígenos atenuados (FERKET, 2004).

Os linfócitos são células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos estranhos e pela montagem de respostas imunes, constituindo uma mistura diversa de populações celulares, cada uma delas com propriedades e funções características como os linfócitos T e B envolvidos na resposta imune celular e humoral, respectivamente (TIZARD, 2002).

Os mecanismos específicos pelos quais a PCL atua sobre a imunidade, no entanto, ainda não estão esclarecidos. Além da capacidade de ligação com patógenos entéricos (SPRING et al., 2000) e de adsorção de micotoxinas potencialmente

imunossupressivas, sugere-se que a manose presente na superfície destes compostos possa estimular a produção de uma lectina que se liga à manose, com importante função de auxiliar a fagocitose, fundamental na resposta imune inata a microrganismos.

A modulação imune decorrente do consumo de prébióticos parece atuar sobre o GALT, tecidos linfóides secundários e células em circulação periférica, conforme recente revisão feita por SCHLEY & FIELD (2002), podendo serem resultantes de: contato direto das células imunes do intestino com as bactérias lácticas ou seus componentes (parece celular e conteúdo citoplasmático); produção de AGCC; alteração na produção de mucina. As bactérias lácticas produzem substâncias com propriedades imunoestimulatórias, como lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos, que interagem com o sistema imune em vários níveis, como na produção de citocinas, na proliferação de células mononucleares, na fagocitose macrófaga e na indução à síntese de imunoglobulinas, em especial as IgA (SILVA & NÖRNBORG, 2003). Isto foi demonstrado por SWANSON et al. (2002), que observaram aumento de IgA em conteúdo ileal de cães suplementados com MOS.

No presente estudo, no entanto, não se verificou mudanças nas populações bacterianas fecais, mas foram verificadas alterações em seu padrão metabólico, evidenciadas pelo aumento de ácido butírico e diminuição de quatro aminas bioativas. Estas mudanças parecem ter sido suficientes para provocar aumento de linfócitos circulantes, mesmo sem a alteração da microbiota. Outros fatores como produção de mucina e a relativa inespecificidade do método de contagem bacteriana por incubação em meio de cultura seletivo (ROBERFROID, 2007), empregado no presente estudo, também devem ser considerados na interpretação destes dados. Esta imunoestimulação reveste-se de importância na alimentação de cães, tendo se apresentado dose-dependente em relação aos linfócitos T e independente da dose de PCL para linfócitos B. Mais estudos são necessários para se compreender melhor esta resposta e seu significado biológico.

As  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas compreendem uma diversidade de proteínas como a antitripsina, proteína C reativa e ceruloplasmina. Estas se encontram envolvidas, na maioria das situações, nos processos inflamatórios (KANEKO, 1997). A redução linear

nas concentrações da  $\alpha$ 1-globulina e  $\beta$ -globulina com a inclusão de PCL sugerem não haver presença de resposta inflamatória, corroborando com os achados hematológicos, especialmente aqueles encontrados no leucograma, que não evidenciam o surgimento de um processo inflamatório após a adição deste elemento na dieta.

A proporção albumina/globulinas (A/G) apresentou-se dentro dos valores normais descritos para cães, bem como as concentrações das demais frações protéicas estudadas. O índice A/G pode sofrer alteração quando da elevação e/ou diminuição de ambas frações protéicas. Em relação às globulinas, sua diminuição, quando expressiva pode resultar em diminuição do índice A/G indicando redução de imunoglobulinas séricas (LASSEN, 2006), um estado de imunodeficiência. Desta forma, a manutenção da relação A/G no presente estudo demonstra que a queda das frações  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas não implicaram em imunossupressão e, na verdade, não apresentam significado biológico. Não foram, no entanto, encontrados trabalhos relatando possíveis efeitos da utilização de oligossacarídeos sobre as concentrações das frações protéicas séricas.

## 6. CONCLUSÕES

A incorporação de parede celular de levedura na dieta de cães foi segura nas doses testadas, não interferindo na digestibilidade, consumo e qualidade das fezes, bem como nas variáveis hematológicas e bioquímicas sérica dos cães. Sua adição não resultou em alterações das populações microbianas das fezes, mas modificou sua atividade metabólica, aumentando a concentração fecal de ácido butírico e reduzindo as de histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina. Seu efeito prebiótico foi comprovado, também, pela imunoestimulação verificada nos cães.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.A. Carbohydrates Nutricines: Non-digestible oligosaccharides. In: \_\_\_\_\_ **Nutricines - Food Components in Health and Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.
- AMBROZINI, S.R. Formulação comercial de alimentos para cães e gatos: uma visão a partir da construção do rótulo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 6º, 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2007. p.65-70.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos. **Avicultura Industrial**, n. 1078, p. 16-30, 2000.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication**. Oxford, 2004.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS (AOAC). **Official and tentative methods of analysis**. Arlington, Virginia: AOAC International, 16.ed., 1995.
- AVELAR, E.C.; FRANÇA, A.S.; FERRAZ, V.P. Desenvolvimento e otimização de metodologia de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de aminas bioativas em alimentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6º, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2005.
- BALLOU, C.E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, v.245, n.5, p.1197-1203, 1970.
- BERNASCONI, M.; ALCÂNTARA, R.L.C. Gestão dos canais de distribuição na indústria de alimentos para cães e gatos. In: INTERNATIONAL PENSA CONFERENCE "SUSTAINABLE AGRI-FOOD AND BIOENERGY CHAINS/NETWORKS ECONOMICS AND MANAGEMENT, 6º, 2007, Ribeirão Preto. **Proceedings...**, 2007.
- BUDDINGTON, R.K.; BUDDINGTON, K.K.; SUNVOLD, G.D. The use of fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract. In: REINHART, G.A., CAREY, D.P. **Recent**

**advances in canine and feline nutrition**, Wilmington: Orange Frazer Press, 2000. p.169-181.

BUDIÑO, F.E.L.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N.; PIZAURO, J.M.Jr.; SANTANA, A.E.; TUCCI, F.M.; FRAGA, A.L.; SCANDOLERA, A.J.; HUAYNATE, R.A.R. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum – Animal Sciences**, v. 26, n.4, p. 529-536, 2004.

BYRNE, K.M.; KIM, H.W.; CHEW, B.P.; REINHART, G.A.; HAYEK, M.G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, n.2, p.167-182, 2000.

CALABRÒ, S.; CUTRIGNELLI, M.I.; BOVERA, F.; CARCIOFI, A.C.; TUDISCO, R.; GUGLIELMELLI, A.; PICCOLO, G. In vitro evaluation of different fiber sources and potential prebiotics for dogs. In: CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY AND COMPARATIVE NUTRITION, 12°, 2008, Vienna. **Proceedings...** Viena: University of Veterinary Medicine Vienna, 2008. p.63.

CARCIOFI, A.C. Emprego de fibras em alimentos para cães e gatos. In.: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 5°, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2005. p.95-108.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v.43, n.3, p.137-154, 1994.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; SALOTTI, B.M.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Coliformes fecais, estafilococos coagulase positiva (ECP), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em lingüiça frescal. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3, p.215-220, 2004.

COTTER, P.F.; SEFTON, A.E.; LILBURNS, M.S. Manipulating the immune system of layers and breeders: novel applications of mannan oligosaccharides. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p.21-27.

CUMMINGS, J.H.; HILL, M.J.; BONES, E.S.; BRANCH, W.J.; JENKINS, D.J.A. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.32, p. 2094-2101, 1979.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.443-459, 1991.

DZANIS, D. Novel ingredients: Safety and utility. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Pet food technology**. Mt. Morris:Illinois, 2003, p. 57-61.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771, 1961.

FAHEY, G.C. Research needs companion animal nutrition. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Pet food technology**. Mt. Morris:Illinois, 2003, p. 135-140.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.

FARKAŠ, V. Polysaccharide Metabolism. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts: metabolism and physiology of yeasts**, 2ed. London: Academic Press, 1989. Vol.3, cap. 9, p. 317-366.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 417p.

FERKET, P.R. Raising drug-free poultry – What are the alternatives? In: POULTRY SERVICE INDUSTRY WORKSHOP, 2004, Alberta. **Proceedings...** Disponível em: <<http://www.poultryworkshop.com/Presentations/Dr.%20Peter%20Ferket/Raising%20Drug%20Free%20Poultry.pdf>>. Acesso em: 18 Set. 2007.

FLEET, G.H. Cell Walls. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts: yeast organelles**. 2ed. London: Academic Press, 1991. Vol.4, cap. 5, p. 199-277.



FLEMMING, J.S. **Utilização de leveduras, probióticos e mannanoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frango de corte.** 2005. 109f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/2344>>. Acesso em: 01 set. 2007.

FLICKINGER, E.A.; SCHREIJEN, E.M.W.C.; PATIL, A.R.; HOUSSEIN, H.S.; GRIESHOP, C.M.; MERCHEN, N.R.; FAHEY Jr.G.C. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2008-2018, 2003.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5º, 2004, Balneário Camboriú. **Anais...** p.06-28.

GARCIA, F. **Suplementação alimentar com beta-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede.** 2008. 100f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GIBSON G.R., ROBERFORID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota, introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.140-1412, 1995.

GLÓRIA, M.B.A. Poliaminas e aminos biogênicas em ração para pequenos animais. In: FÓRUM PET FOOD DA AMÉRICA LATINA, 5º, 2006, São Paulo. **Anais...** 2006, p.14.

GRIESHOP, C.M. The interaction of nutrition and the immune system: the role of fatty acids, antioxidants and carbohydrates. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 18º, 2002, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Nottingham University Press, 2002. p. 481-487.

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

HÁFEZ, S. Mercado e tendências do *pet food* no Brasil. In.: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2º, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2002. p.1-2.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9<sup>th</sup>. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HUME, I.D. Fermentation in the hindgut of mammals. In: MACKIE, R.I.; WHITE, B.A. **Gastrointestinal microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1997. cap. 4, p. 84-115.

HUSSEIN, H.S.; FLICKINGER, E.A.; FAHEY, G.C.Jr. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1454-1456, 1999.

HUSSEIN, S.H.; SUNVOLD, G.D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: REINHART, G.A., CAREY, D.P. Recent advances in canine and feline nutrition, Wilmington: Orange Frazer Press, 2000, v.3, p.153-168.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n.1, p.124-135, 2005.

KANEKO, J.J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup>. San Diego: Academic Press, 1997. p.117-138.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932p.

KAWAUCHI, I.M. **Farelo de glúten de milho 21 na alimentação de cães adultos**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D.F., HANSON, C.A., HARTUBISE, P.E. **Flow citometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994. p.1.

KOLLÁR, R., REINHOLD, B.B.; PETRÁKOVÁ, E.; YEH, H.J.C.; ASHWELL, G.; DRGONOVÁ, J.; KAPTEYN, J.C.; KLIS, F.M.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell

wall: Beta(1—>6)-glucan interconnects mannoprotein, Beta(1—>3)-glucan and chitin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n.3, p. 1170-1178, 1995.

LASSEN, E.D. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: THRALL, M A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, 2006, São Paulo: Roca, p. 376- 390.

LAYNER, L.L. Flow cytometry reveals the complexity and diversity of the immune system. In: **Clinical flow cytometry – principles and application**. Baltimore: Library of congress, 2002. cap. 4, p. 63-70.

LODDI, M.M. **Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico em dietas para frangos de corte**. 2003. 83 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MACARI, M., MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...**, Campinas: FACTA, 2000. p.161-174.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v. 18, p.999-1003, 1999.

MAFRA, I.; HERBERT, P.; SANTOS, L.; BARROS, P.; ALVES, A. Evaluation of biogenic amines in some portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p. 128-132, 1999.

MIDDELBOS, I.S.; GODOY, M.R.; FASTINGER, N.D.; FAHEY, G.C.Jr. 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, p.3022–3032, 2007.

MONTASSIER, H.J. Imunologia do aparelho digestório das aves. In: CURSO DE FISIOLOGIA DA DIGESTÃO E METABOLISMO DOS NUTRIENTES EM AVES. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Centro Virtual de Ciência Avícola, 2004, CD-ROM.

MORRISON, M.; MACKIE, R.I. Biosynthesis of nitrogen-containing compounds. In: MACKIE, R.I.; WHITE, B.A. **Gastrointestinal microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1997. cap. 12, p. 424-469.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, DC: National Academy Press, 2006.

O'CARRA, R. **An assessment of the potential of mannan oligosaccharides as immunostimulants**. Thesis (M.S.). Nat'l Univ. of Ireland, Galway, 1997.

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

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall formation and structure. **Micron**, v.29, n.2/3, p.207-233, 1998.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of Prebiotics and Probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p.627–631, 2003.

PEIXE, T.S.; NASCIMENTO, E.S.; DELLA ROSA, H.V. Determinação de fenol urinário por cromatografia em fase gasosa em trabalhadores que utilizam resinas fenólicas em fundições. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p.279-287, 2006.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Ciências Agrárias e da Saúde. Fundação Educacional de Andradina**, v. 2, n.1, p.59-64, 2002.

PELÍCIA, K.; MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B.; PIZZOLANTE, C.C.; TAKAHASHI, S.E.; MOREIRA, J.; GARCIA, R.G.; QUINTEIRO, R.R.; PAZ, I.C.L.A.; KOMIYAMA, C.M. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.3, p.163–169, jul-sep, 2004.

PRYCE, J.D. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analist**, v.94, p.1121-1151, 1969.

- RAMOS, S.R.; VAZ, F.A.C.; MANISSADJIAN, A. Mecanismos de defesa do trato gastrointestinal peculiaridades no recém-nascido. **Pediatria**, v.7, p.175-180, 1985.
- REBAR, A.H.; MACWILLIAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.; METZGER, F.L.; ROCHE, J. **Guia de hematologia para cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. 291p.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34,supl.2, p.105-110, 2002.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137, p.830S–837S, 2007.
- ROBINOW, C.F.; JOHNSON, B.F. Yeast cytology: An overview. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The Yeasts: yeast organelles**, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1991. v.4, cap. 2, p. 7-120.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. 424p.
- ROSSATO, S.B. **Níveis de histamina em diferentes vinificações**. 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centros de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- RUSSO, A. **Pet food cresce mas não anima a indústria**. Disponível em: <<http://www.petbr.com.br/repor31.asp>>. Acesso em: 02 nov. 2008.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, jan/mar., 2006.
- SCHLEY, P.D.; FIELD, C.J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, Suppl.2, p.S221-S230, 2002.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, n.7, p.675-690, 1996.
- SHANE, S.M. Mannanligosaccharides in poultry nutrition: mechanisms and benefits. In: ALTECH'S 17TH INTERNATIONAL FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 2001, Lexington. **Proceedings...** Lexington: Nottingham University Press, 2001, p.65-67.

SILVA, E.N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000, v. 2, p. 241-251.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

SILVA, V.K. **Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas**. 2006. 151f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SMITH, P.D.; SAINI, S.S.; ORENSTEIN, J.M. Infections of the large intestine in the immunocompromised host. In: PHILLIPS, S.F.; PEMBRTON, J.H.; SHORTER, R.G. *The large intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*. New York: Raven Press, 1991. p. 437-444.

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

STONE, C.W.; MILLS, D.V. **Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals**. 2007. Disponível em: <[http://www.engormix.com/e\\_articles\\_view.asp?art=243&AREA=MAS](http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=243&AREA=MAS)>. Acesso em: 04 nov. 2008.

STRICKLING, J.A.; HARMON, D.L.; DAWSON, K.A.; GROSS, K.L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influence on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.205-219, 2000.

SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C.Jr. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. In: **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, p.19-35, 2006.

SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C.Jr. **Prebiotics in companion animal nutrition**. 2007. Disponível em: <[http://www.engormix.com/e\\_articles\\_view.asp?art=414&AREA=MAS](http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=414&AREA=MAS)>. Acesso em: 04 nov. 2008.

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

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

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa, 2003.p.35-60, 2003.

TIZZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Roca, São Paulo. 2002, 532 p.

TZORTZIS, G.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Canine functional foods. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 1, p.1-11, 2003.

VALE, S.R.; GLORIA, M.B. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**. v.80, n.5, p.1006-1012, 1997.

VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; BRANDT, E.; FAHEY, G.C.Jr.; SWINGS, J. Molecular monitoring and characterization of the fecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. **FEMS Microbiology Letters**, v.249, p.65-71, 2005.

VERNAU, W. **Flow cytometry assessment of hematopoietic neoplasia in the dog**. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American college of veterinary pathologist & 30<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of clinical pathology, 2004.

- VICKERS, R.J.; SUNVOLD, G.D.; KELLEY, R.L.; REINHART, G.A. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.609–615, 2001.
- VOGT, L.K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 151f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, 2005.
- WENK, C. Prebiotics in companion animals. In: **Recent advances in pet nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2006, p.47-55.
- WOLF, B.W.; FIRKINS, J.L.; ZHANG, X. Varying dietary concentrations of fructooligosaccharide affect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. **Nutrition Research**, v.10, p.1791–1806, 1998.
- YANG, Y.; IJI, P.A.; KOCHER, A.; MIKKELSEN, L.L.; CHOCT, M. Effect of mannanoligosaccharide on growth performance, the development of gut microflora, and gut function of broiler chickens raised on new litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 2, p.280-288, 2007.
- ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, 1682S-1684S, 2002. Suppl.
- ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T.; BALLÈVRE, B.; ROCHAT, F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.87, p.397–407, 2003.