

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA ADIÇÃO DE MOS E FOS, ASSOCIADOS
ANTES OU APÓS A EXTRUSÃO, EM DIETAS PARA CÃES

Autora: Karla dos Santos Felsner

Orientador: Prof. Dr. Claudio Scapinello

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

MARINGÁ
Estado do Paraná
abril– 2013

EFEITO DA ADIÇÃO DE MOS E FOS, ASSOCIADOS ANTES OU APÓS A EXTRUSÃO, EM DIETAS PARA CÃES

Autora: Karla dos Santos Felssner

Orientador: Prof. Dr. Claudio Scapinello

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
abril– 2013

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

F324e Felssner, Karla dos Santos
Efeito da adição de MOS e FOS, associados antes ou após a extrusão, em dietas para cães / Karla dos Santos Felssner. -- Maringá, 2013.
50f. :il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Scapinello.
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2013.

1. Amônia. 2. Extrusão. 3. Prebióticos. 4. Saúde intestinal - cães. 5. Uréia sérica. I. Scapinello, Claudio, orient. II. Vasconcellos, Ricardo Souza, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 21.ed.613.2



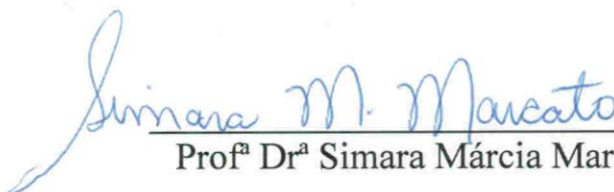
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS


**EFEITO DA ADIÇÃO DE MOS E FOS, ASSOCIADOS
ANTES OU APÓS A EXTRUSÃO, EM DIETAS
PARA CÃES**


Autora: Karla dos Santos Felssner
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Scapinello

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 05 de abril de 2013.


Prof^ª Dr^ª Simara Márcia Marcato


Prof. Dr. Carlos Maia Betini


Prof. Dr. Cláudio Scapinello
(Orientador)

*“Que eu continue com vontade de viver,
mesmo sabendo que a vida é em muitos momentos,
uma lição difícil de ser aprendida.
Que eu permaneça com vontade de ter grandes amigos,
mesmo sabendo que, com as voltas do mundo,
eles vão indo embora de nossas vidas.
Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas,
mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de
sentir, entender ou utilizar essa ajuda.
Que eu mantenha meu equilíbrio,
mesmo sabendo que muitas coisas que vejo no mundo
escurecem meus olhos.
Que eu realmente a minha garra,
mesmo sabendo que a derrota e a perdasão ingredientes
tão fortes quanto o sucesso e a alegria.
Que eu atenda sempre mais à minha intuição,
que sinaliza o que de mais autêntico eu possuo.
Que eu pratique mais o sentimento de justiça,
mesmo em meio à turbulência dos interesses.
Que eu manifeste amor por minha família,
mesmo sabendo que ela muitas vezes
me exige muito para manter sua harmonia.
E, acima de tudo...
Que eu lembre sempre que todos nós
fazemos parte dessa maravilhosa teia chamada vida,
criada por alguém bem superior a todos nós!
E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos
de alguns e, sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós”!*

Chico Xavier

À minha amada mãe,

Iraci Joana dos Santos,

Por tudo o que representas para mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado forças em mais esta jornada, guiando-me e iluminando-me em minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Scapinello, pela confiança, quando me admitiu no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM, e por toda a disposição e competência com que sempre exerceu seu papel de orientador. Agradeço-lhe imensamente: -és um exemplo de profissional e pessoa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, pela paciência, por todo o auxílio, disposição e apoio concedidos desde o início e, em todos os momentos, fornecendo fundamentais contribuições para a confecção desta dissertação.

À Prof^a. Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, por ter disponibilizado a estrutura necessária à condução deste projeto e, sobretudo, por ter me recebido de braços abertos em Lavras-MG. Obrigada pela confiança, apoio e grande ajuda. Minha imensa gratidão!

Ao Prof. Dr. Cloves Cabreira Jobim, pela confiança, grande ajuda e inestimável colaboração, facilitando nosso contato com a indústria para a obtenção das dietas experimentais para a realização deste estudo. Muito obrigada!

À empresa Kowalski e, sobretudo, ao Zootecnista Walter Cuelho, por ter contribuído de maneira valiosa para a realização deste projeto de pesquisa.

À Prof^a. Dra. Paula Adriana Grande, pela confiança, paciência e grande colaboração, mostrando-se sempre pronta a ajudar no que fosse preciso.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, Bruna Ponciano Neto, Ivan Graça Araújo e Yuri De Gennaro Jaruche, Taynara Prestes Perine, Bruna Susan de Lábio Molina pela amizade e pelos momentos em que compartilhamos dúvidas, angústias, e sobretudo, compartilhando conhecimento.

ÀS Pós-Graduandas da UFLA, Rosana Claudino Silva Ogoshi, Jéssica Santana dos Reis, Fernanda Sayuri Ebina, por terem me recebido em Lavras-MG com todo carinho, sempre me auxiliando em todas as minhas atividades com muita boa vontade e disposição. Meus sinceros agradecimentos e gratidão.

Aos estagiários do CENAC, Matheus Reis, Maiara Oliveira, Sabine Rocha Lima, Gabriela De Menezes Paes, João Vitor Cotrin, obrigada pela grande colaboração e ajuda e ao Sr. Ednaldo, funcionário do CENAC, obrigada por todo auxílio durante o período do experimento.

À querida médica veterinária Mariana Porsani, pela imensa ajuda e colaboração, sempre muito atenciosa, disposta e prestativa.

Aos técnicos do LANA, Cleuza Volpato, Creusa de Azevedo e Roberto Carlos D'Ávila, pelo auxílio nas técnicas de laboratório.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelos ensinamentos transmitidos e competência com que administraram suas aulas na pós-graduação.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em especial ao Denilson dos Santos Vicentin, por toda paciência e atenção.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa, auxiliando para a concretização deste estudo.

Aos inesquecíveis cães: Rubi, Sophia, Princesa, Brida, Sara, Samantha, Tobias, Cristal, Júlia, Pipoca, Melisso, Bonny, Scooby, Valentin, Manchinha, Coragem, Bernardinho e Bred, minha alegria diária em Lavras. Criaturinhas sublimes com as quais aprendi a amar em tão pouco tempo.

Aos meus fiéis e amados cães, Gorducha (*in memoriam*), Pitukinha, Lua e Raio, por me proporcionarem tantos momentos de extrema felicidade. Meus eternos companheiros e razões da minha vida!

Ao meu namorado, Humberto Todesco, pelo carinho, companheirismo, paciência e grande ajuda em muitos momentos desta jornada.

À minha amada mãe, Iraci Joana dos Santos, por todo amor e apoio na concretização de mais um sonho. Amo você, minha mãe querida!

Ao meu pai, Carlos Hermano Felssner e meus irmãos, Kati dos Santos Felssner e Carlos Hermano dos Santos Felssner, que mesmo distantes sempre me apoiaram e quiseram o melhor para mim. Amo vocês!

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

KARLA DOS SANTOS FELSSNER, filha de Carlos Hermano Felssner e Iraci Joana dos Santos, nasceu em Paranavaí, Paraná, no dia 26 de setembro de 1980.

Em março de 2006, iniciou o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM/PR, concluindo-o em novembro de 2010.

Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Não-Ruminantes.

No dia 5 de abril de 2013, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRAT	xi
I - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Processos fisiológicos no intestino grosso dos cães	3
2. Prebióticos	13
2.1 Frutoligossacarídeos (FOS).....	14
2.2 Mananoligossacarídeos (MOS)	18
3- Estabilidade térmica dos prebióticos	21
II - OBJETIVOS	24
Materiais e Métodos.....	25
Resultados e Discussão.....	30
Conclusões.....	42
Literatura citada	43

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1–Principais grupos de bactérias no intestino dos cães	6
Tabela 2 –Funções da microbiota intestinal no trato gastrointestinal normal	12
Tabela 3– Concentração de frutoligossacarídeos em alguns ingredientes utilizados em alimentos para cães	16
Tabela 4 – Propriedades funcionais de alguns açúcares não digestíveis	21
Tabela 5 – Composição química, na matéria seca, das dietas experimentais	25
Tabela 6 – Peso corporal dos animais, consumo de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e energia metabolizável (EM) das dietas controle e das dietas com a inclusão dos prebióticos antes ou após o processo de extrusão	32
Tabela 7 – Consumo, absorção, excreção e retenção de N e BN dos cães	34
Tabela 8 – Parâmetros fecais e urinários dos cães alimentados com dieta controle e com a inclusão dos prebióticos antes ou após a extrusão	37
Tabela 9 – Uréia sérica pós-prandial (mg/dL) dos cães alimentados com dieta controle e com a inclusão dos prebióticos antes ou após a extrusão	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Mecanismo proposto pela fermentação seletiva de prebióticos e subsequente produção de ácidos graxos de cadeia curta, resultando em prevenção a colonização de microrganismos patogênicos, aumento da absorção de minerais na dieta, e menor risco de câncer de cólon. CRITTENDEN et al., (2006). SCFA= Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC).....	8
Figura 2- Estrutura química dos oligômeros de frutose dos FOS compostos de : (A) 1-Ketose GF ₂ , (B) Nistose GF ₃ , (C) Frutofuranosil nistose GF ₄ (OGUEKE et al., 2010).	15
Figura 3 - Estrutura da inulina. UENO et al (2011).....	16
Figura 4 - Degradação de inulina a partir de chicória durante o tratamento térmico por 60 minutos, a temperaturas entre 100 e 195 °C. Adaptado de BÖHM et al. (2005).	22
Figura 5 – Incrementos de uréia sérica pós-prandial dos cães alimentados com dieta controle e com inclusão da mistura dos prebióticos antes ou após a extrusão	40

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos de uma mistura de mananoligossacarídeos (MOS) e frutoligossacarídeos (FOS), na proporção de 1:1 adicionados a uma dieta comercial para cães, antes ou após o processo de extrusão, sobre os coeficientes de digestibilidade aparente das dietas, energia metabolizável, metabolismo do nitrogênio (curva de uréia sérica pós-prandial, balanço orgânico de nitrogênio, concentração fecal de amônia e excreção de uréia urinária) e parâmetros fermentativos fecais (pH fecal e concentrações de ácidos graxos de cadeia curta). Foram utilizados 18 cães adultos da raça Beagle, distribuídos ao acaso em três tratamentos, sendo uma ração controle mais duas dietas em que a mistura dos prebióticos foram adicionados antes ou após o processo de extrusão das rações. Não houve diferença na digestibilidade, energia metabolizável, teor de amônia fecal e de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) entre as dietas controle e com adição dos prebióticos. Entretanto, os cães suplementados com prebiótico, antes ou após a extrusão, apresentaram menor pH fecal ($p < 0,05$) em relação à dieta controle e foi observado ainda redução na concentração pós-prandial de uréia sérica ($p < 0,0001$) nos animais que receberam prebióticos, observados pelas áreas abaixo da curva de uréia e do seu incremento. O processo de extrusão não afetou os efeitos biológicos destes prebióticos sobre os parâmetros avaliados nos cães. Possíveis mecanismos implicados no efeito dos prebióticos sobre a redução nas concentrações de uréia sérica são a diminuição na formação e absorção intestinal de amônia, favorecidas pela redução no pH intestinal. Estes achados podem ser considerados no uso de prebióticos em nutrição clínica.

Palavras-chaves: Amônia. Extrusão. Prebióticos. Saúde intestinal. Ureia sérica.

ABSTRAT

The goals of this study were to evaluate the effects of a Mannanligosaccharide (MOS) and a Frutoligosaccharide (FOS) mixture in a 1:1 ratio added to a commercial diet for dogs before or after the extrusion process on the apparent digestibility coefficient of the diet sand on the metabolizable energy, nitrogen metabolism (postprandial blood urea curve, organic nitrogen balance, fecal concentration of ammonia and excretion of urinary urea) and fecal fermentation parameters (fecal pH and concentrations of short chain fatty acids). 18 adult Beagle dogs were used and randomly distributed into three treatments, being a control diet plus two diet sin which the mixture of prebiotic swere added before or after the extrusion of the ration. There was no difference in digestibility, metabolizable energy, fecal ammonia content and short-chain fatty acids (acetic, propionic and butyric) between the control diet and the ones with the addition of prebiotics. However, the dogs supplemented with prebiotics before or after extrusion, had a lower fecal pH ($p < 0,05$) compared to those in the control diet and a reduction in the post prandial blood urea concentration ($p < 0,0001$) was also observed in the animals receiving prebiotics, observed by the áreas below the curve of urea and it sincrement. The extrusion process did not affect the biological effects of prebiotics on the parameters evaluated in dogs. The possible mechanisms involved in the effect of prebiotics on the reduction in the concentrations of blood urea are the reduction in the formation and intestinal absorpion of ammonia, favored by the reduction of intestinal pH. These findings can be considered in the use of prebiotics in clinical nutrition.

Keywords: Ammonia. Extrusion. Prebiotics. Intestinal health. Blood urea.

I - INTRODUÇÃO GERAL

A relação entre cães e humanos tem se tornado mais próxima, especialmente nas últimas décadas, onde a função de companhia destes animais aos seres humanos tem ganhado destaque. Esta proximidade tem exigido a ampliação do conhecimento em sanidade, manejo e nutrição destes animais favorecendo maior longevidade. Entretanto, com o aumento da expectativa de vida, a interface nutrição/doença tem ganhado mais importância. Hoje, os alimentos não são apenas vistos como veículo de nutrientes essenciais para atender as exigências nutricionais para o crescimento e manutenção, mas como contribuintes para a prevenção de doenças e melhoria na qualidade de vida (CUTRIGNELLI, 2011).

Nesse contexto, além do conhecimento sobre exigências nutricionais básicas, merecem destaque, os alimentos funcionais e os nutracêuticos, sendo este último definido, segundo a Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (SBAF), como “suplementos dietéticos que apresentam uma forma concentrada de um possível agente bioativo de um alimento e, usado para melhorar a saúde, em dosagens excedentes daquelas que poderiam ser obtidas do alimento normal”. Desta forma, o uso dos prebióticos, devido aos benefícios verificados ao sistema imunológico e a saúde intestinal de uma maneira geral, tem ganhado interesse nas pesquisas.

Por definição, prebiótico é um ingrediente alimentar não digestível por enzimas e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de determinadas bactérias benéficas no cólon, promovendo a saúde do hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

Os principais prebióticos estudados são as frutanas semelhantes à inulina (oligofrutose, frutoligossacarídeos e inulina), galactanas (galactoligossacarídeos e trans-galactoligossacarídeos) e as mananas (mananoligossacarídeos extraídos da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*). Na nutrição animal, os estudos com frutanas e mananas são mais comuns e, conseqüentemente, estas substâncias são mais amplamente empregadas pela indústria, embora para a comprovação de seus efeitos benéficos, ainda sejam necessárias mais pesquisas, uma vez que os resultados das pesquisas ainda são controversos.

As frutanas são polímeros de frutose, podendo ser naturais, derivados de plantas (inulina) ou sintéticos, resultante da polimerização da frutose (GIBSON e ROBERFROID, 1995). As mananas ou mananoligossacarídeos (MOS) são oligossacarídeos derivados das paredes de leveduras, amplamente empregadas nos processos fermentativos industriais. A parede celular da levedura é formada por glucanas e por mananas, em proporções similares, além de proteínas.

No cólon os MOS são moderadamente fermentados por *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (VICKERS et al., 2001). No entanto, parece que o principal mecanismo de ação dos MOS ocorre por ligação direta em sítios específicos dos microrganismos patogênicos, impedindo sua colonização intestinal (SPRING et al., 2000). Por outro lado, os FOS são altamente fermentáveis por bactérias lácticas no intestino, enquanto microrganismos gram-negativos, como *Salmonella* spp. e *E. coli* são incapazes de fermentá-los. As bifidobactérias presentes no intestino grosso secretam a β -frutosidase (enzima que seria responsável pela hidrólise dos FOS), responsável pela liberação dos monômeros de frutose. Estes monossacarídeos são fermentados e, com isto, o pH intestinal é reduzido, inibindo as bactérias putrefativas. Como resultado desta ação, também é mantida baixa a concentração intestinal de bacterióides, clostrídio ou coliformes, contribuindo, assim, na prevenção de doenças intestinais (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

A amônia é produzida no intestino grosso como resultado da fermentação bacteriana da uréia endógena (reciclagem de uréia no organismo) e de aminoácidos não digeridos e pode ser absorvida quase na sua totalidade por mecanismo de transporte passivo no intestino grosso. Sua metabolização ocorre no fígado, podendo ser rapidamente transformada em uréia ou glutamina e, então, eliminada na urina (WRONG e VINCE, 1984). A amônia é um composto indesejável ao organismo, uma vez que eleva o pH intestinal e apresenta toxicidade em altas concentrações, embora por outro

lado também seja capaz de fornecer nitrogênio para a síntese endógena de aminoácidos. Sabe-se que a manutenção do pH intestinal levemente ácido reduz a atividade de desaminases intestinais e bactérias produtoras de urease, culminando com a redução na produção de amônia intestinal (VINCE e BURRIDGE, 1980). Devido à estreita relação entre o pH intestinal, produção de amônia e concentração sanguínea de uréia, os prebióticos podem modificar o metabolismo do nitrogênio no organismo.

Os prebióticos são comumente empregados pela indústria nos alimentos, anteriormente ao processo de extrusão. No entanto, o processamento térmico pelo qual os alimentos extrusados passam é muito agressivo para algumas moléculas, ocasionando perdas de alguns nutrientes e complexação de moléculas. Por este motivo, é importante se conhecer a resistência de aditivos e nutrientes ao processo de extrusão antes de adicioná-los no alimento. Pouco se conhece sobre a tolerância do FOS e MOS às condições de temperatura, pressão e umidade aos quais são submetidos os alimentos extrusados.

Considerando este potencial efeito benéfico das frutanas e das mananas na saúde intestinal e que ambas apresentam mecanismos de ação complementares no trato digestório, o presente estudo teve por objetivos verificar a hipótese de que a associação destes dois prebióticos em dietas para cães apresentará efeitos benéficos sobre o metabolismo do nitrogênio dos animais e parâmetros fermentativos fecais. Outra hipótese relacionada ao processamento da dieta será comparar os efeitos da associação destes prebióticos adicionados antes ou depois do processo de extrusão, com a hipótese de que a extrusão não afetará os efeitos destes prebióticos sobre os parâmetros avaliados nos cães.

1. Processos fisiológicos no intestino grosso dos cães

As principais funções do intestino grosso nos cães incluem a absorção de água e eletrólitos. Além disso, serve como um ambiente para fermentação microbiana dos nutrientes que escaparam da digestão enzimática e absorção no intestino delgado. Diferentemente do intestino delgado, o intestino grosso não apresenta vilosidades o que lhe confere uma menor capacidade absorptiva e, mesmo sendo capaz de absorver eficientemente água e eletrólitos, não possui mecanismos de transporte ativo.

Juntamente com um grande volume de água, o sódio é absorvido no organismo pelo intestino grosso (CASE et al., 1998).

O intestino grosso dos cães é relativamente curto e simples. Cães em que o corpo mede 0,75 m de comprimento apresentam intestino com aproximadamente, 4,5 m de comprimento, sendo a maior proporção, o intestino delgado medindo 3,9 m (área da superfície interna do jejuno com 54 cm² e íleo 38 cm²) e aproximadamente 0,6 m de intestino grosso. Composto pelo ceco, cólon e reto, o cólon corresponde à maior fração do intestino grosso sendo constituído por três seções: cólon ascendente, transverso e descendente. A mucosa possui uma superfície lisa, sem vilosidades, sendo constituída pelas criptas de Lieberkuhn, as quais são compostas por células mucosas e células epiteliais (NRC, 2006).

O muco produzido no intestino grosso protege a superfície mucosa de lesões, ocasionadas, pelo contato abrasivo com resíduos alimentares e até mesmo corpos estranhos, além de proporcionar o meio aderente para a formação do bolo fecal. O muco protege ainda a parede intestinal da invasão de um grande número de bactérias potencialmente patogênicas existentes no lúmen do intestino grosso (GUYTON 1996).

A reabsorção de água e eletrólitos ocorre, primariamente, no cólon ascendente e transverso. Após a reabsorção, os resíduos fecais são movidos por movimentos peristálticos até o reto, onde o bolo fecal será armazenado antes da defecação. O tempo de residência das fezes no intestino de cães é de aproximadamente 12 horas (SIMPSON, 1998) e também apresenta influência direta sobre a fermentação intestinal.

MEYER e SCHUNEMANN (1989) relataram que apenas 8% da digestão total do alimento ocorrem no intestino grosso dos cães, embora essa percentagem seja variável de acordo com a composição e características físicas do alimento. Os autores avaliaram 25 dietas para cães fistulados no íleo terminal, e verificaram que em dietas altamente digestíveis, a digestão no intestino grosso correspondia de 1 a 4% da digestibilidade total, enquanto dietas contendo batata crua e lactato, a digestibilidade no intestino grosso correspondia de 12 a 24% do total. Isto está relacionado à chegada de uma maior quantidade de compostos no intestino grosso, não digeridos pelas enzimas endógenas no intestino delgado, como as fibras, tornando-se substratos fermentativos para a microbiota do cólon. Devido às ligações do tipo β presentes nas fibras, estas são resistentes à hidrólise por enzimas digestivas presentes nas membranas dos enterócitos (α -glicosidase, maltase, isomaltase, sacarase) que são específicos para ligações do tipo α . Uma vez que a hidrólise é limitada, os produtos não digeridos passam através da

partes superior do trato gastrointestinal para o cólon, local em que serão digeridos apenas por enzimas bacterianas, caracterizando o processo fermentativo (KAUR e GUPTA, 2002).

Os micróbios são as menores formas de vida e caracterizando uma população altamente densa e diversificada. Da mesma forma, o corpo humano e animal, incluindo o trato gastrointestinal (TGI), boca, pele e trato urogenital abrigam comunidades microbianas complexas (KIL & SWANSON, 2011). Logo após o nascimento, as superfícies e mucosas dos animais, que, em condições fetais, são estéreis, rapidamente sofrem colonização por diversos microrganismos. Destes, alguns são considerados benéficos e outros potencialmente patogênicos. A microbiota intestinal benéfica auxilia na digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminui, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (GIBSON, 1999). Já a microbiota nociva pode causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e causar distúrbios sistêmicos no hospedeiro, quando em contato com a corrente sanguínea. A região primária de colonização microbiana em humanos e animais é o trato gastrointestinal. Estima-se que o intestino contenha, aproximadamente, 10^{10} a 10^{14} unidades formadoras de colônias de microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) compostas de 500 a 1.000 espécies diferentes, cerca de 10 vezes mais do que o número de células que compõem o corpo do hospedeiro. (SUCHODOLSKI, 2011). O número de bactérias totais no intestino delgado de cães e gatos aumenta, gradualmente, a partir do duodeno e jejuno de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colônia por grama (UFC. g^{-1}) para a extremidade do íleo (10^7 UFC. g^{-1}). Fatores tais como pH, peristaltismo, nutrientes disponíveis, potencial de oxidação-redução dentro do tecido, idade do hospedeiro, saúde do hospedeiro, aderência de bactérias, bactérias de cooperação, secreções de mucina contendo imunoglobulinas, bactérias antagonistas, e tempo de trânsito influenciam os números e diversidade das bactérias presentes nas diferentes regiões do TGI (ROBERFROID et al., 2008).

Eubacterium, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são as bactérias anaeróbias mais comuns, enquanto *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Escherichia* e *Enterobacter* são os mais comuns aeróbios e anaeróbios facultativos em cães e gatos. O número de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas é semelhante ao de bactérias anaeróbias no jejuno de cães. No intestino delgado de cães e gatos, *Clostridium perfringens*, *Clostridium*

difficile, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium*, entérico *Helicobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* foram identificados como potenciais patógenos bacterianos para as espécies (BUDDINGTON, 2003). Quando estas bactérias patogênicas aderem à superfície epitelial do intestino, invadem as camadas de mucosa ou produzem enterotoxinas ou ambos, o que muitas vezes resulta em doenças inflamatórias intestinais e diarreia (KIL & SWANSON, 2011).

A contagem total de bactérias modifica-se ao longo do TGI e varia também entre o lúmen intestinal e a mucosa. A cavidade oral é considerada a maior fonte de bactérias colonizadoras do TGI. O número de bactérias na boca de cães saudáveis é de 10^7 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de secreção residual, composto por uma diversa população de bactérias aeróbias e anaeróbias. As colônias de bactéria no estômago variam entre 10^1 e 10^6 UFC/g de secreção residual.

Na Tabela 1, são mostrados os principais grupos bacterianos presentes no intestino delgado e grosso de cães.

Tabela 1-Principais grupos de bactérias no intestino dos cães

Local	Grupo de bactéria	Contagem log. UFC/g
Intestino delgado		
	<i>Espirilos</i>	3.0 a 6.8
	<i>Bacterioides</i>	0 a 5.5
	<i>Lactobacillus</i> SP.	1.0 a 5.4
	<i>Streptococcus</i> spp	3.0 a 5.2
	<i>Escherichia coli</i>	2.3 a 5.0
	<i>Clostridium perfringens</i>	1.0 a 2.5
Intestino grosso		
	<i>Bacterioides</i>	7.3 a 10.2
	<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.0 a 10.0
	<i>C. perfringens</i>	5.5 a 8.0
	<i>Clostridium</i> spp.	7.3 a 9.5
	<i>E. coli</i>	6.4 a 8.6
	<i>Lactobacillus</i> spp.	5.5 a 9.0
	<i>Prevotella</i>	7.0 a 8.5
	<i>Ruminococcus</i>	7.0 a 8.0
	<i>Staphylococcus</i> spp.	5.2 a 5.3
	<i>Streptococcus</i> spp.	8.8 a 9.1

Adaptado de SUCHODOLSKI (2011).

Osmicrorganismos do cólon têm ampla oportunidade de degradar substratos disponíveis. A grande maioria das bactérias no cólon são anaeróbios estritos e, portanto, produzem energia a partir da fermentação. Os principais substratos para o crescimento bacteriano são os carboidratos não-digeríveis, chamados de fibra dietética, que escapam da hidrólise e absorção no intestino delgado. Carboidratos não-digeríveis compreendem amido e dextrinas resistentes, polissacarídeos não-amiláceos, oligossacarídeos não digestíveis (frutanas semelhantes a inulina, galactoligosacarídeos, lactulose, isomaltoligosacarídeos, xiloligosacarídeos, frutoligosacarídeos, mananoligosacarídeos, rafinose e estaquiose), bem como porções não digeridas de dissacarídeos (lactose) e álcoois de açúcar (lactitol, sorbitol e isomalte) (BOUHNİK et al., 1997; CUMMINGS & MACFARLANE 1991; NRC, 2006).

A fermentação da fibra dietética pelas bactérias anaeróbias, resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC são compostos que possuem entre 1 a 7 átomos de carbono e os principais são: ácido acético (C_2), ácido propiônico (C_3) e ácido butírico (C_4), os quais são responsáveis por 90 a 95% do total dos AGCC no cólon (DASS et al., 2007). São rapidamente absorvidos a partir do cólon e são geralmente considerados benéficos para o hospedeiro (WINDEY et al., 2012). Outros metabólitos incluem piruvato, lactato, etanol, succinato, bem como os gases hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e ácido sulfídrico (H_2S) (LIN e VISEK., 1991). Além disso, as bactérias são capazes de obter energia para seu crescimento e função celular (GIBSON et al., 1996). Dados de pesquisa de várias populações mostram que os AGCC fecais seguem a seguinte ordem: (acetato > propionato > butirato). Outros ácidos orgânicos (por exemplo, lactato ou succinato de cadeia curta ou de cadeia ramificada gerada a partir de aminoácidos) são encontrados em menores quantidades (CAMPBELL, 1997a).

A produção dos AGCC, como resultado da fermentação de nutrientes e de secreção endógena, estimula a absorção de água e eletrólitos, portanto, é envolvida com a função osmorregulatória do intestino. Além disso, a absorção dos AGCC aumenta a taxa de absorção de sódio, e esta combinação da absorção dos AGCC e sódio no intestino grosso aumenta a absorção de água (NRC, 2006). Os AGCC acidificam o pH do lúmen suprimindo o crescimento de agentes patogênicos e também influenciam na motilidade intestinal (DASS et al., 2007) (Figura 1).

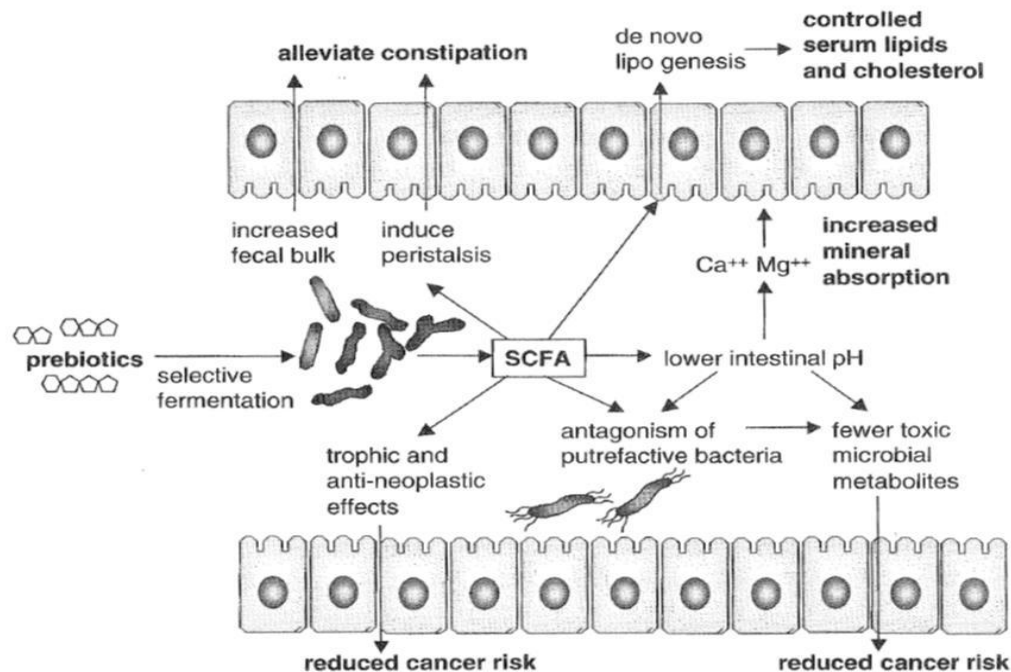


Figura 1- Mecanismo proposto pela fermentação seletiva de prebióticos e subsequente produção de ácidos graxos de cadeia curta, resultando em prevenção a colonização de microrganismos patogênicos, aumento da absorção de minerais na dieta, e menor risco de câncer de cólon. CRITTENDEN et al., (2006). SCFA= Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC).

O acetato é metabolizado principalmente no músculo, rim, coração e cérebro, e o propionato metabolizado pelo fígado, sendo um possível substrato gliconeogênico e pode contribuir para a inibição da síntese de colesterol. Por outro lado, o butirato é amplamente metabolizado pelo epitélio do cólon, o qual serve como principal fonte de energia destas células, bem como um regulador do crescimento e diferenciação celular (CUMMINGS, 1997) e regulador dos processos imunológicos (PATURI et al., 2012). Funções adicionais ao butirato, incluem, a inibição da carcinogênese e inflamação no cólon, assim como, na redução do estresse oxidativo, reforçando a barreira de defesa do cólon. A maior parte do butirato absorvido é metabolizado pelo epitélio do cólon, o que resulta em concentrações baixas de butirato no sangue portal (HAMER et al., 2008).

Os metabólitos derivados da fermentação microbiana, tais como os ácidos orgânicos e secreções endógenas afetam o pH no intestino grosso, que resulta em uma

mudança para um pH ácido, assim, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (PATURI, 2012).

Outro grupo de substâncias fermentadas no intestino grosso, as quais contribuem para o desenvolvimento das bactérias, são as proteínas, peptídeos e aminoácidos, sendo as principais espécies proteolíticas pertencentes aos *Bacterioides* e *Clostridium* (ROBERFROID, 2007). As proteínas que chegam ou são produzidas no cólon, são fermentadas a ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) tais como isobutirato, isovalerato e uma série de compostos nitrogenados e sulfurados. Ao contrário dos produtos da fermentação de carboidratos que são reconhecidos como benéficos para a saúde, alguns dos produtos finais do metabolismo de aminoácidos podem ser tóxicos para o hospedeiro, como, amônia, aminas e compostos fenólicos (MACFARLANE & MACFARLANE 1995). Consequentemente, o excesso de fermentação de proteínas, especialmente no cólon distal de humanos e ratos, tem sido associado a estados de doença, tais como câncer do cólon e síndrome do intestino irritável, que inicia geralmente na região distal do intestino grosso antes de afetar áreas mais proximais. (ROBERFROID, 2008).

A degradação de proteínas no cólon começa com a hidrólise das proteínas e peptídeos em aminoácidos pelas proteases e peptidases bacterianas que são mais ativas em pH neutro para alcalino. No cólon proximal, o pH é mais ácido devido à produção de AGCC à partir da fermentação de carboidratos. Após a progressão para a parte distal do cólon, ocorre diminuição dos carboidratos, o pH aumenta e a fermentação das proteínas torna-se mais eficiente. Embora os AGCC sejam os produtos finais principais da fermentação dos carboidratos, eles também são produzidos a partir de muitos aminoácidos por desaminação redutora (BLACHIER et al., 2007).

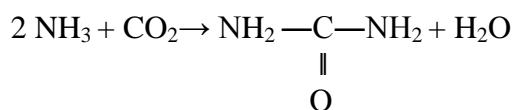
Ao contrário dos AGCC, os AGCR são exclusivos da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada. Isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato são produzidos a partir da fermentação de valina, leucina e isoleucina, respectivamente (SMITH & MACFARLANE, 1997). A degradação bacteriana de aminoácidos aromáticos no cólon resultam na produção de compostos fenólicos e indólicos (indól, 3-metilindol, 2-metilindol, 2,3-metilindol e 2,5-metilindol). Já os produtos da degradação da tirosina incluem: 4-hidroxifenilpiruvato, 4-hidroxifenilactato, 4-hidroxifenilpropionato e 4-hidroxifenilacetato, bem como fenol, p-cresol e 4-etilfenol. O metabolismo bacteriano da fenilalanina conduz a derivados semelhantes, tais como, fenilpiruvato, fenilactato, fenilacetato e fenilpropionato. Já a

degradação do triptofano gera indol, 3-metilindol (escatol), 3-metilindol e 2,5-metilindol (HUGHES et al., 2000).

A fermentação de aminoácidos sulfurados, tais como metionina, cisteína, cistina e taurina, por bactérias sulfato-redutoras, resultam na produção de sulfeto de hidrogênio, o qual é considerado um composto tóxico (LEWIS, 2007).

Ainda, as espécies de bactérias proteolíticas, que incluem os gêneros *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* e algumas espécies de *Eubacterium* também produzem aminas biogênicas, amônia, fenóis, entre outros (TESHIMA, 2003). A amônia é produzida pelas bactérias por meio da desaminação dos aminoácidos e através da hidrólise da uréia produzida endogenamente, sendo esta última catalisada pela atividade da urease bacteriana (BLACHIER et al., 2007). Devido à degradação bacteriana e reciclagem de nitrogênio endógeno, o epitélio do cólon está constantemente exposto à amônia a qual pode alterar o metabolismo intermediário e a morfologia das células epiteliais intestinais, aumentar a síntese de DNA e de proteínas úteis, enquanto que elevadas concentrações de sete metabólitos no lúmen do cólon resultam em efeitos adversos sobre a saúde intestinal (SMITH & MACFARLANE, 2006; HUSSEIN, 1999).

Até 3,5 a 4,0 g de amônia são liberadas diariamente no intestino (VISEK, 1978), resultando em concentrações luminiais em humanos de até 60 mmol/kg de conteúdo luminal (MACFARLANE & CUMMINGS, 1986). Grandes quantidades de amônia são formadas pelo processo de desaminação, sendo que quantidades adicionais são continuamente formadas no intestino pelas bactérias e, a seguir, absorvidas para a corrente sanguínea. A desaminação dos aminoácidos é necessária para que eles possam ser utilizados na produção de energia ou para que possam ser convertidos em carboidratos ou gorduras. Pode ocorrer certo grau de desaminação em outros tecidos do organismo, sobretudo nos rins (GUYTON, 2006). A amônia liberada durante a desaminação é quase totalmente removida do sangue por sua conversão em uréia; duas moléculas de amônia e uma molécula de dióxido de carbono combinam-se de acordo com a seguinte reação:



O estrogênio é utilizado para a síntese de proteína, e, em massa, excretado ou utilizado pelas bactérias para o seu próprio metabolismo. Após sua formação, a uréia se difunde das células hepáticas para os líquidos corporais, sendo excretada na urina pelo rim (GUYTON e HALL, 1996). Poucos estudos em cães têm verificado os efeitos da fermentação intestinal sobre o metabolismo do nitrogênio e aproximadamente 99% da amônia produzida no intestino pelos processos de fermentação é absorvida e direcionada ao fígado para a síntese de aminoácidos ou de uréia.

Na Tabela 2, pode-se verificar a relação entre as populações bacterianas e os produtos resultantes da fermentação de nutrientes por estas bactérias.

Tabela 2 -Funções damicrobiota intestinalno tratogastrointestinal normal

Atividade microbiana	Produtos	Representantes
Descarboxilação e deaminação de aminoácidos	Amônia	<i>Clostridium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Peptococcus</i> spp.
Desconjugação e desidroxilação dos ácidos biliares	Ácidos biliares secundários (cólico e dexocólico)	<i>Clostridium hiranonis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.
Síntese de vitaminas	K ₂ , B ₁₂ , biotina e ácido fólico	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
Fermentação de carboidratos	Lactato, propionato, acetato e butirato	<i>Clostridium</i> cluster XIVa, <i>Prevotella</i> spp., <i>Faecalibacterium</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.
Fermentação de aminoácidos	Hidrogênio, metano, aminas, fenóis, amônia, ácidos orgânicos e sulfeto de hidrogênio	Bactéria redutora de sulfato (SRB), <i>Desulfovibrio</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.
Degradação do oxalato	Metanoato e CO ₂	<i>Oxalobacter formigenes</i>
Degradação de inulina e amido	Lactato	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Metabolismo do H ₂ , álcool e ácido acético	Metano e CO ₂	Metanobactéria

Adaptado de SUCHODOLSKI (2011).

2. Prebióticos

As propriedades nutricionais dos prebióticos são relacionadas diretamente às alterações fisiológicas que eles induzem no hospedeiro (VENTER, 2007). O conceito de prebiótico enfatiza a estimulação específica de uma determinada microbiota a qual conduz a uma redução da atividade de bactérias, potencialmente prejudiciais. Bactérias potencialmente benéficas são ainda caracterizadas pela ausência de vias metabólicas secundárias que conduzem à formação de metabólitos tóxicos, por exemplo, xenobióticos ou fitoquímicos (ROBERFROID, 2010). Os efeitos benéficos podem ser relacionados com seu metabolismo, ou seja, perfis de fermentação e produtos finais, capacidade de produção de vitaminas, antioxidantes, defesa contra agentes potencialmente prejudiciais, troca de sinais moleculares entre os diferentes gêneros e espécies, mas também com as células epiteliais (ROBERFROID, 2010).

A maior parte dos prebióticos identificados são os carboidratos e oligossacarídeos com diferentes estruturas moleculares que ocorrem normalmente na dieta humana e animal. Carboidratos dietéticos, tais como fibras, são candidatos a prebióticos, no entanto, os mais promissores são os oligossacarídeos não digeríveis (ONDs). Os ONDs que atendem à definição de prebióticos são os frutooligosacarídeos (FOS, oligofrutose e inulina), galactooligosacarídeos (GOS), transgalactooligosacarídeos (TOS) e lactulose. No entanto, um grande número de outros ONDs também estudados são glucoligosacarídeos, glicoligosacarídeos, lactitol, isomaltoligosacarídeos, maltoligosacarídeos, xilo-oligosacarídeos, estaquiose, rafinose, sacarose e oligossacarídeos térmicos foram também investigados (GAGGIA et al., 2010). Os mananoligosacarídeos (MOS), derivados da parede celular de leveduras, têm sido utilizados da mesma maneira como os prebióticos listados acima.

Na década de 1980, pesquisadores japoneses demonstraram que oligossacarídeos não digestíveis (especialmente frutooligosacarídeos) foram seletivamente fermentados por bactéria considerada benéfica do gênero *Bifidobacterium*, as quais apresentavam capacidade de proliferação em fezes humanas. Estas observações foram confirmadas por Gibson & Roberfroid, os quais introduziram o conceito de prebiótico em 1995. Segundo a definição inicial, de GIBSON & ROBERFROID em (1995), eles eram considerados um ingrediente alimentar não digestível que beneficia o organismo por

estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de determinadas bactérias no cólon, promovendo a saúde do hospedeiro.

A literatura recente, entretanto, não restringe o cólon com único sítio ativo e define prebiótico como um ingrediente alimentar seletivamente fermentado que permite mudanças específicas, tanto em composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, promovendo benefícios à saúde e bem-estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2010).

Para que um substrato alimentar possa ser classificado como um prebiótico, pelo menos três critérios são necessários: (1) Ser resistente (parcialmente ou totalmente) à acidez gástrica, hidrólise por enzimas dos mamíferos, e absorção gastrointestinal; (2) Ser fermentado pela microbiota intestinal; e (3) Estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias intestinais que promovam a saúde e bem-estar (ROBERFROID, 2007).

Um prebiótico não deve estimular o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, tais como *Clostridium*, bactérias proteolíticas e *Escherichia coli* (MANNING e GIBSON, 2004). Como resultado, uma composição microbiana saudável no intestino grosso é obtida por meio do consumo de prebióticos.

2.1 Frutoligossacarídeos (FOS)

Os FOS e inulina são polímeros e oligômeros de frutose que pertencem ao grupo das frutanas, unidos por ligação do tipo β (2 \rightarrow 1). Os FOS pertencem a um grupo heterogêneo de carboidratos com a característica de possuir resíduos de frutose como a maioria dos seus monômeros. São amplamente distribuídos no reino vegetal, particularmente em banana, trigo, cevada, cebola, alho, espargos e alcachofras de Jerusalém (*helianthus tuberosus*) (CAMPBELL et al., 1997b; ROBERFROID, 2002).

Os FOS disponíveis comercialmente são produzidos, enzimaticamente, a partir de dissacarídeos ou polissacarídeos naturais se consistem de cadeias moleculares com um grau de polimerização (GP) abaixo de 9. Um grupo de FOS é derivado da hidrólise enzimática parcial da inulina, utilizando endo-inulinas e também podem ser sintetizados a partir da sacarose por um processo de transfrutossilacção, por meio da enzima β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* (YUN, 1996). Os FOS principais consistem de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e 1F- β frutofuranosil-

nistose(GF4), que são oligômeros de uma unidade de glicose e de dois, três e quatro unidades de frutose, respectivamente (Figura 2). As ligações frutose-glicose são sempre α -(1 \rightarrow 2), as ligações frutose-frutose são β -(2 \rightarrow 1) (ROBERFROID, 2007; CAMPBELL et al., 1997b).

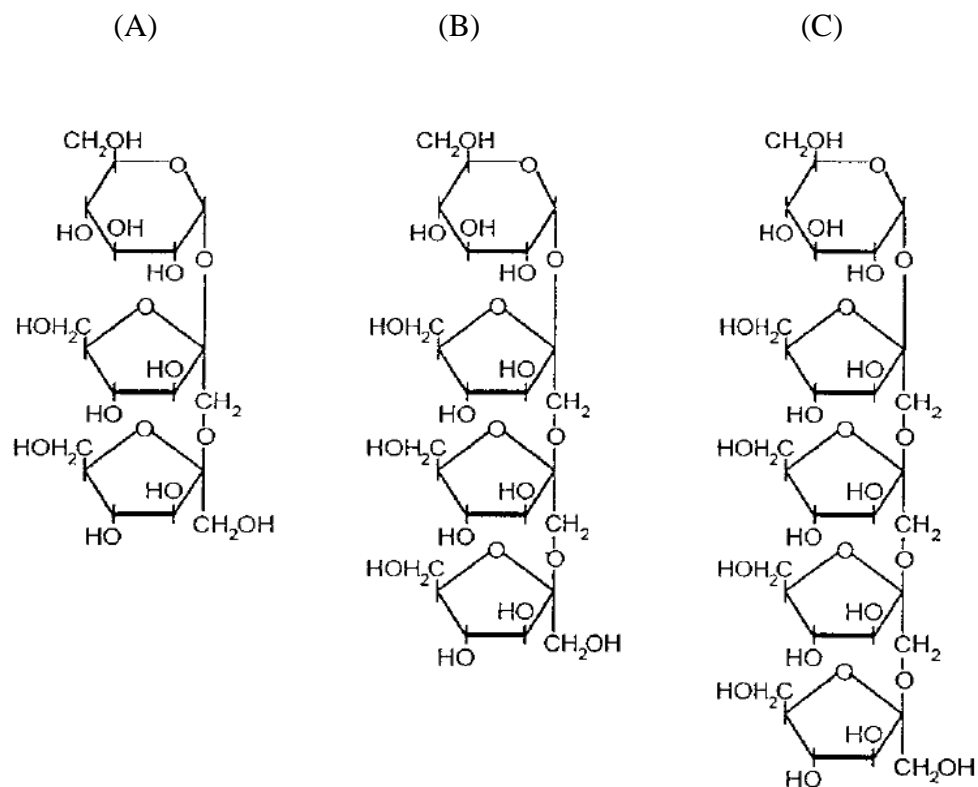


Figura 2- Estrutura química dos oligômeros de frutose dos FOS compostos de : (A) 1-Ketose GF₂, (B) Nistose GF₃, (C) Frutofuranosil nistose GF₄ (OGUEKE et al., 2010).

A inulina é um tipo de frutano largamente encontrada na natureza para a armazenagem de energia das plantas (NINESS 1999). É encontrada naturalmente em uma variedade de plantas, em alguns fungos e bactérias. Fontes comuns incluem as raízes de chicória (*Cichorium intybus*), alcachofra de Jerusalém (*helianthus tuberosus*), cebola, alho e aspargos (PALFRAMAN., et al). A inulina pode também ser sintetizada enzimaticamente a partir da sacarose (NINESS, 1999; ROBERFROID, 2002). De um ponto de vista estrutural, é um polissacarídeo composto de unidades de D-frutofuranose β (2 \rightarrow 1) ligada a um resíduo D-glicosil na extremidade da cadeia (UENO et al. 2011). Dependendo da fonte, o GP varia entre 20 a 60 (ROBERFROID, 2007).

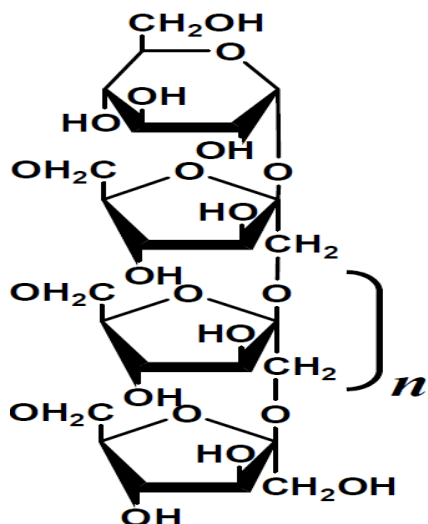


Figura 3 -Estrutura da inulina. UENO et al (2011).

Os FOS apresentam cadeias curtas e são higroscópicos, pois sua capacidade de retenção de água é superior à da sacarose, não cristalizam e não precipitam. Por se tratar de um açúcar não-redutor, o FOS não é susceptível à formação de compostos de Maillard e são estáveis a pH superior a 3 e temperatura de até 140° C (BORNET, 1994). A solubilidade atingida na água a 25° C é de 80%, sendo solúvel em etanol a 80%, pH 2 e 0° C, diferenciando-se de outros polissacarídeos (BORNET, 1994; SILVA et al., 2007). Resistem a processos térmicos, como a pasteurização, não são cariogênicos, uma vez que não são utilizados como substrato por *Streptococcus mutans*, microrganismo responsável pelo aparecimento de doença periodontal (SAAD, 2006), não cristalizam, não precipitam e não deixam sabor residual. A inulina é menos solúvel, apresenta cadeias longas (GP até 60) e capacidade para formar microcristais quando misturada com água e leite (VANLOO et al., 1998). A presença de frutoligossacarídeos em alguns ingredientes usados na alimentação de cães pode ser encontrada na Tabela 3.

Tabela 3– Concentração de frutoligossacarídeos em alguns ingredientes utilizados em alimentos para cães

Ingrediente	Concentração de FOS em mg/g de MS ¹			
	GF ₂	GF ₃	GF ₄	Total
Aveia	0,36	-	-	0,36
Cevada	1,46	0,43	0,03	1,92
Polpa de beterraba	0,05	-	-	0,05
Farelo de canola	0,04	-	-	0,04
Farelo de glúten de milho	0,03	0,19	0,11	0,34
Farelo de arroz	0,14	-	-	0,14
Farelo de trigo	3,82	0,19	-	4,0
Farelo de arroz	0,14	-	-	0,14
Gérmen de trigo	2,15	0,21	2,32	4,68
Casca de soja	0,12	-	-	0,12

¹Frações dos oligômeros de frutose: 1-kestose (1-kestotriose; GF₂), nistose (1,1-kestotetraose; GF₃) e 1-frutofuranosil-nistose (1,1,1-kestopentaose, GF₄).

Adaptado de HUSSEIN et al.(1998)

O efeito prebiótico dos FOS ocorre devido à configuração β do C₂ anomérico nos monômeros de frutose, o que torna essas moléculas resistentes à hidrólise pelas enzimas do trato superior do TGI, as quais são específicas para ligações α -glicosídicas (ROBERFROID 2007). Os FOS são altamente fermentáveis por bactérias lácticas no intestino, enquanto microrganismos gram-negativos, como *Salmonella* spp. e *E. coli* são incapazes de fermentá-los. As bifidobactérias presentes no IG, secretam a β -frutosidase (enzima que seria responsável pela hidrólise dos FOS), diminuindo o pH fecal e destruindo as bactérias putrefativas. Também são mantidas baixas as concentrações de bacterióides, clostrídios ou coliformes, contribuindo na prevenção do câncer de cólon, pela inibição da produção de compostos tóxicos resultantes da atividade fermentativa destes microrganismos (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Sendo assim, os FOS favorecem o desenvolvimento da microbiota não-patogênica em detrimento de microrganismos patogênicos, como demonstrado por alguns estudos (SWANSON et al., 2002a; MIDDELBOSS et al., 2007; HIDAHA et al., 1990).

Os FOS podem ser ainda associados à diminuição da potencialidade de várias patologias em humanos e animais, normalmente associado com um elevado grau de bactérias intestinais patogênicas como, doenças autoimune, câncer, constipação, intoxicação alimentar, problemas digestivos, intolerância a alimentos e gases intestinais (PASSOS e PARK, 2003). MIDDELBOSS et al. (2007), estudando diferentes fontes de fibra (celulose, polpa de beterraba, FOS e MOS), encontraram maior concentração de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. nas fezes de cães alimentados com fibras fermentáveis em relação aos cães que receberam uma dieta com celulose.

A suplementação com FOS pode reduzir a produção de compostos putrefativos (fenóis, indóis e amônia), os quais contribuem para o mau odor das fezes e para a carcinogênese do cólon (SWANSON et al., 2002a). Trabalhando com a inclusão de 0,2 e 0,4% de inulina e FOS na dieta de cães adultos, BARRY et al. (2009) encontraram diminuição das concentrações de fenóis e aminas biogênicas nas fezes. Por outro lado, estes autores não observaram mudanças nos parâmetros imunológicos avaliados, concluindo que maiores concentrações são necessárias para alterar a microbiota e parâmetros imunológicos. Ainda, como resultado da fermentação intestinal a promoção do crescimento de membros benéficos da microbiota intestinal, os prebióticos podem influenciara defesa do hospedeiro. Através do aumento do número de bifidobactérias, haverá uma maior competição com bactérias patogênicas e parasítios de ligação sobre o epitélio intestinal e de nutrientes, inibindo assim, a sobrevivência das cepas patogênicas (LOMAX & CALDER, 2009).

Trabalhando com a inclusão de 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5% de polidextrose na dieta, BELOSHAPKA et al. (2012) encontraram diminuição nos teores de indóis fecais, aumento da matéria seca fecal e aumento nas concentrações de acetato, propionato e AGCC totais nas fezes de cães alimentados com o maior nível de polidextrose na dieta.

Também foi relatado por FABER et al. (2011), diminuição do pH das fezes, e aumento nas concentrações fecais de acetato, propionato e AGCC totais de cães alimentados com galactomananas na dieta. O aumento da fermentação provavelmente seja devido à disponibilidade de substrato no intestino grosso resultando em diminuição do pH das fezes. Resultados opostos foram relatados por BARRY et al. (2009), os quais obtiveram diminuição nas concentrações de acetato, propionato e AGCC totais nas fezes de cães suplementados com 0,4% de inulina na dieta. Os autores justificam esses resultados pelo fato da quantidade utilizada seja a mínima para promover fermentação. Além disso, a absorção dos AGCC ocorre no cólon ascendente do cão, em vez do cólon descendente como ocorre frequentemente, quando concentrações maiores de frutanos são incluídas nas dietas.

2.2 Mananoligossacarídeos (MOS)

Os MOS são oligossacarídeos complexos obtidos a partir da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) a qual consiste de uma estrutura complexa de manose fosforilada, glucose e proteína. Em média, a parede celular de levedura é composta por 75 a 90% de polissacarídeos, integrados por um complexo de β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6)-D-glucano e quitina mais componentes amorfos denominados mananoproteínas (FURLAN et al., 2004).

Enquanto os β -D-glucanos e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular e definem sua forma, as mananoproteínas e sua porção de carboidrato α -D manano são responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio-ambiente e determinam a especificidade imunológica de leveduras. Os dois principais polissacarídeos constituintes da parede celular das leveduras (β -D-glucanos e α -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). A alteração da microbiota intestinal causada pelo uso de prebióticos pode ocorrer de duas maneiras: através do fornecimento de nutrientes para as bactérias desejáveis ou através do reconhecimento, pelas bactérias patogênicas, de sítios de ligações nos oligossacarídeos como sendo da mucosa intestinal, reduzindo a colonização intestinal indesejável, resultando em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal (SWANSON et al., 2002b). Para que as bactérias consigam colonizar o trato intestinal e criar uma condição patológica, precisam inicialmente aderir-se à superfície epitelial. Esta adesão ocorre através de glicoproteínas (lectinas ou fímbrias) que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, se eles se ligarem a um açúcar ou oligossacarídeo dietético, e não à mucosa intestinal, irão passar com a digesta sem causar problemas digestivos para os animais. Desta forma, os mananoligossacarídeos são capazes de bloquear a aderência dos patógenos e evitar a colonização (FURLAN et al., 2004)

As fímbrias adesivas tipo-1, as quais são comuns em numerosos gêneros e espécies, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, são específicas por manano-resíduos. Sendo assim, os MOS podem diminuir a colonização de patógenos, agindo como receptor análogo por fímbrias tipo-1, reduzindo o número de sítios de ligação disponíveis e/ou ligando-se aos microrganismos, os quais serão carreados para fora do hospedeiro (SPRING et al., 2000).

Estudo realizado por KIM et al., (2011) sobre a suplementação de 0,25% de FOS e 0,05% de MOS em frangos de corte, demonstrou diminuição nas populações de *Clostridium perfringens* e *E. coli*, e aumento na população de *Lactobacillus*. Devido aos efeitos benéficos encontrados, os autores sugerem o uso dos prebióticos como uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento. MIDDELBOS et al. (2007), também observaram redução significativa na concentração de *E. coli* em cães suplementados com parede de levedura e SWANSON et al., (2002a) encontraram aumento de *Lactobacillus* no IG de cães adultos.

GOUVEIA et al. (2006) constataram a efetividade do MOS em cães com idade entre 2 e 6 meses com quadros de gastroenterite, havendo a eliminação da *Escherichia coli* patogênica em 85,71% dos animais, enquanto que, no grupo sem o MOS, apenas 25% não apresentaram o microrganismo. Neste estudo, o MOS foi efetivo no controle da *E. coli* patogênica, sendo indicado como tratamento adjuvante nas gastroenterites.

Os MOS são capazes de induzir a ativação de macrófagos, saturando os receptores de manose das glicoproteínas da superfície celular, que se projetam da superfície da membrana celular dos macrófagos. Uma vez que três ou mais lugares tenham sido saturados, inicia-se uma reação em cadeia que dá origem à ativação dos macrófagos e à liberação de citocinas, com a instalação de uma resposta imunológica adquirida (MACARI e MAIORKA, 2000). A suplementação diária de 2 g de MOS e 2 g de FOS, conjuntamente na dieta, apresentou os melhores resultados em relação à saúde intestinal dos cães, com aumento da resposta imune local (44% a mais de IgA) e diminuição de compostos putrefativos. Provavelmente, devido ao efeito sinérgico desses dois prebióticos, em modular a microbiota intestinal pela ação de acidificação e fornecimento de energia do FOS e diminuição da colonização da mucosa por microrganismos patogênicos pelos MOS (SWANSON et al., 2002a).

MIDDELBOS et al. (2007), relatam diminuição no pH das fezes de cães, recebendo 0,45% de parede de levedura na dieta. Resultado semelhante foi descrito por ZENTEK et al. (2002), os quais obtiveram diminuição no pH fecal e menor concentração de amônia nas fezes de cães suplementados com 1g.kg de peso corporal/dia de MOS, em relação à dieta controle.

Considerando o elevado teor protéico empregado em muitos alimentos comerciais para cães e que muitos dos produtos de fermentação protéica podem predispor o aparecimento de doenças nos animais, a utilização de prebióticos nos alimentos pode apresentar benefícios neste sentido.

3- Estabilidade térmica dos prebióticos

A estabilidade dos prebióticos durante o processamento é um requisito muito importante, dado que os efeitos biológicos dos prebióticos dependem da sua integridade estrutural. Os FOS possuem características que permitem sua aplicação em várias áreas. Na indústria de alimentos para humanos, são indicados para formulações dietéticas, como sorvetes, cremes vegetais, patês, entre outros, e adicionados em barras de cereais e biscoitos para elevar o conteúdo de fibras alimentares, produtos de panificação, além de bebidas lácteas e leites fermentados. Também são empregados em produtos alimentares para animais (SILVA et al., 2007). A utilização de FOS com sucesso na indústria de alimentos se deve a inúmeras propriedades (SILVA et al., 2007). Os FOS não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento sendo estáveis até 140°C (BORNET, 1994) (Tabela 4).

Tabela 4 – Propriedades funcionais de alguns açúcares não digestíveis

Açúcar não digestível	Estabilidade		Viscosidade	Higroscopicidade
	Calor (°C)	pH		
Sorbitol	< 160	2-10	Baixa	Alta
Xilitol	< 160	2-10	Muito baixa	Alta
Manitol	< 160	2-10	Baixa	Baixa
Eritritol	< 160	2-10	Muito baixa	Baixa
Isomalte	< 160	2-10	Alta	Baixa
Lactilol	< 160	2-10	Muito baixa	Média
Frutoligossacarídeo	< 140	> 3	Semelhante a sacarose	Média

Adaptado de BORNET (1994).

Embora os prebióticos sejam muito empregados em uma variedade de alimentos processados (ROBERFROID et al. 2010), durante o processamento os carboidratos, sofrem alterações diferentes, tais como a reação de Maillard, caramelização e hidrólise (DUAR, 2011). Assim, a interação do prebiótico com a matriz circundante e o efeito que o tratamento pode ter sobre a sua estrutura em deser

considerada (HUEBNER et al. 2008). Na indústria alimentar, a inulina é muito utilizada, na produção de alimentos com baixo índice glicêmico destinados a diabéticos e hidrolisada para produzir xaropes de frutose (HOFER et al. 1999). Além disso, a inulina melhora as propriedades físicas e organolépticas dos alimentos e pode ser usada como um substituto de gordura (MATUSEK et al., 2008; BIRKETT et al., 2009).

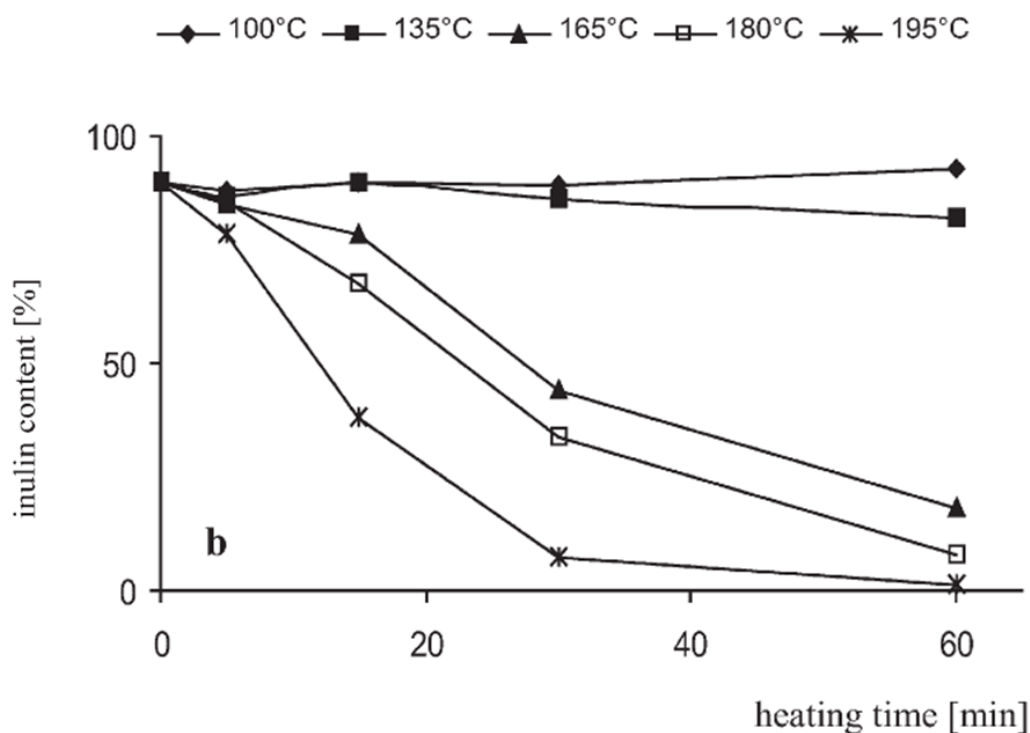


Figura 4 - Degradação de inulina a partir de chicória durante o tratamento térmico por 60 minutos, a temperaturas entre 100 e 195 °C. Adaptado de BÖHM et al. (2005).

A aplicação de prebióticos na indústria PetFood, ocorre principalmente no processo de fabricação de rações extrusadas. A prática mais comumente usada ocorre, com a inclusão dos prebióticos juntamente com os ingredientes que compõem a formulação, anteriormente ao processo de extrusão. A extrusão é o principal processo para fabricação de alimentos para animais de estimação, e dentre a ampla variedade de alimentos disponíveis no mercado, mais de 90% são extrusados (SAAD et al., 2005).

A combinação das variáveis envolvidas no processamento da dieta, como a umidade, pressão, calor e cisalhamento permitem que as matérias primas modifiquem suas características estruturais, funcionais e nutricionais durante a extrusão, ocorrendo várias mudanças químicas e físicas simultaneamente (EL-DASH, 1982). Portanto, a

combinação de pressão, temperatura, viscosidade e fluidez podem influenciar na textura final do produto, na densidade, cor e propriedades funcionais (MURRAY, 2001). No presente estudo, as condições de temperatura do processo de produção das rações experimentais, se mantiveram dentro da faixa adequada de temperatura, na qual os prebióticos demonstram ser resistentes como relatado por BOURNET, (1996), possivelmente, mantendo desta forma, suas características funcionais.

II - OBJETIVOS

Avaliar os efeitos de uma mistura de mananoligossacarídeos (MOS) e frutoligossacarídeos (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% de uma dieta controle antes ou após o processo de extrusão sobre:

- coeficiente de digestibilidade total aparente dos nutrientes e energia metabolizável das dietas;
- metabolismo nitrogenado, avaliado pelas concentrações fecais de amônia, curva de uréia sérica pós-prandial e balanço orgânico de nitrogênio;
- indicadores fecais dos processos fermentativos intestinais: pH fecal e quantificação de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes (ácido acético, propiônico, butírico).

Materiais e Métodos

Foram utilizados 18 cães adultos (4-7 anos de idade), machos e fêmeas da raça Beagle, sadios, vacinados e desverminados, com peso médio de $14,0 \pm 1,2$ kg, procedentes do Centro de Estudos em Nutrição e Alimentação de Animais de Companhia (CENAC), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, nos meses de julho e agosto de 2012.

Os tratamentos foram compostos por uma dieta comercial (Vital Can PRO, Kowalski Alimentos S.A., Apucarana - PR, Brasil), fornecida ao grupo controle e duas com adição da mistura dos prebióticos Mananoligossacarídeos (MOS) e Frutoligossacarídeos (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle antes ou após o processo de extrusão. A formulação e composição química das dietas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição química, na matéria seca, das dietas experimentais

Item ¹	Controle ²	MOS/FOS antes ^{2,3}	MOS/FOS após ^{2,4}
Proteína bruta	33,1	31,5	33,3
Extrato etéreo ácido	19,2	18,5	18,8
Fibra bruta	1,3	1,5	1,7
Matéria mineral	11,0	11,2	10,8
Extrativos não – nitrogenados ⁵	28,7	29,8	28,8
Energia bruta (kcal/kg)	4908,3	4893,0	4987,5

¹Todas as amostras foram analisadas em duplicata aceitando-se um coeficiente de variação < 5%.

²Composição básica do alimento Controle (Vital Can PRO, Kowalski Alimentos S.A., Apucarana, Brasil) Ingredientes: Carne Hidrolizada, Farinha de Vísceras de Aves com Ossos, Ovo Desidratado, Plasma em Pó, Nucleotídeos, Farinha de Peixe, Quirera de Arroz, Milho Integral Moído, Farelo de Trigo, Semente de Linhaça, Óleo de Vísceras de Aves, Extrato de Yucca, Zeolita, Polpa de Beterraba, DL-Metionina, Vitamina C, Palatabilizante, Aditivo Antifúngico Fungistático, Aditivo Antioxidante, Premix Vitamínico mineral, Cloreto de Sódio (Sal Comum).

Enriquecimento por Kilograma de ração: 20000 UI de vitamina A; 20000 UI de vitamina D₃; 48mg de vitamina E; 4mg de vitamina B₁; 8mg de vitamina B₂; 32mcg de vitamina B₁₂; 4,8mg de vitamina K₃; 56mg de niacina; 16mg de ácido pantotênico; 800mg de colina; 0,20mg de selênio; 15mg de cobre; 150mg de zinco; 30mg de manganês; 1,5mg de iodo.

³Mistura dos prebióticos mananoligossacarídeos (MOS) e frutoligossacarídeos (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle antes do processo de extrusão.

⁴Mistura de 1% de prebiótico fonte de mananoligossacarídeo (MOS) e frutoligossacarídeo (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle após o processo de extrusão.

⁵Estimado por: ENN (%) = 100 – (MM% + PB% + EEA% + FB%).

O ingrediente fonte de mananoligossacarídeos (MOS) utilizado foi o produto comercial Bio-MOS (Alltech Tools do Brasil), composto por extrato da parede celular de levedura e o ingrediente fonte de inulina utilizado foi o produto Oraft IPS (Beneo Oraft SA, Bélgica) contendo 90% de inulina.

As dietas experimentais foram produzidas na indústria Kowalski Alimentos S.A., Apucarana - PR, Brasil, em extrusora de rosca simples (Wenger - X235). As condições de temperatura do processo de produção das rações foram: condicionador (90°C), extrusora (80°C) e secador (130°C), com tempo de permanência da ração extrusada no secador de 35 minutos. Para o procedimento de aplicação à dieta seca extrusada, os prebióticos em pó, foram previamente manuseados, sendo pesados na proporção de 1:1, homogeneizados e misturados a ração seca extrusada em misturador “horizontal” por 5 minutos. Na dieta com adição dos prebióticos antes do processo de extrusão, os mesmos foram adicionados na proporção de 1:1 no misturador junto aos ingredientes. As dietas foram recobertas com gordura de aves e palatilizante e armazenada em sacos de fios plásticos (nylon) e identificadas.

Os cães foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em três tratamentos e seis observações por tratamento, totalizando 18 observações. O experimento teve duração de 15 (quinze) dias, sendo distribuídos da seguinte forma:

- dias 1-10: ensaio de digestibilidade, energia metabolizável, balanço de nitrogênio, determinação do consumo de nutrientes e qualidade fecal;
- dias 11-13: determinação do pH fecal;
- dia 14: colheita de fezes para a determinação das concentrações de amônia e AGCC;
- dia 15: coleta seriada de sangue para determinação da curva de uréia sérica pós-prandial.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e a energia metabolizável (EM) das rações utilizadas foram determinados pelo método *in vivo*, segundo o procedimento de coleta total de fezes e urina (AAFCO, 2004). Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais de 70 cm altura x 85 cm comprimento x 70 cm largura; onde permaneceram dez dias, sendo cinco dias de adaptação às gaiolas e cinco dias para a colheita total das fezes e urina.

Os alimentos foram fornecidos aos cães uma vez ao dia, às 08:30 horas, em quantidade suficiente para atender às necessidades de energia metabolizável (NEM) do animal segundo a fórmula: $NEM = 130 \times \text{Peso corporal}^{0,75}$, preconizada pelo

National Research Council (NRC, 2006). A água foi fornecida à vontade. Durante o período de colheita de fezes e urina, todas as fezes foram colhidas, pesadas e congeladas (-15°C) e a urina recolhida em recipiente plástico contendo 1ml de ácido sulfúrico (1 Eq/L), para evitar a volatilização de nitrogênio e proliferação de bactérias. Após a coleta foi armazenada uma alíquota de 30% do volume da urina produzida de cada animal, sendo então mantidas em freezer a (-15°C).

A avaliação do escore fecal dos cães foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador, atribuindo-se notas de 1 a 5, sendo: 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 e que não aderem ao piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas (SÁ-FORTES, 2005).

Ao final do período de colheita, as fezes e urina foram descongeladas e homogeneizadas, compondo-se uma amostra por animal. Posteriormente, as amostras de fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Em seguida, as amostras de fezes e ração, foram moídas em moinho com peneira de 1,0 mm. As amostras então foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca (MS) a 105 °C, proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), matéria mineral (MM) e energia bruta (EB) segundo SILVA & QUEIROZ (2002) e extrato etéreo em hidrólise ácida, determinado por sistema de extração automático (Ankom Hydrolysis System, Ankon Technology Modelo HCL I, Nova York, USA).

A fração correspondente aos extrativos não-nitrogenados (ENN) foi determinada segundo a fórmula:

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

Para a determinação da EB da urina, as amostras foram descongeladas e filtradas em papel de filtro. Posteriormente, cerca de 3 mL de urina foram colocadas em cápsulas de polietileno previamente pesadas em balança analítica. As cápsulas contendo urina (3 ml) foram levadas à estufa de ventilação forçada a 55°C, até quase completa secagem das amostras (dezoito a vinte e quatro horas). Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando 9 mL de urina, tendo-se o cuidado de não deixar a amostra secar completamente. O conteúdo de energia bruta das dietas, fezes e urina foi determinado em bomba calorimétrica (PARR Instrument Co. AC720, EUA).

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente das dietas, pelo procedimento de coleta total (AAFCO, 2004):

$$\text{CDA\%} = [(\text{nutriente ingerido} - \text{nutriente excretado}) / \text{nutriente ingerido}] \times 100.$$

O balanço de nitrogênio (BN) foi calculado pela diferença entre o nitrogênio ingerido (N_{ingerido}) e excretado nas fezes (N_{fecal}) e urina (N_{urinário}), pela seguinte fórmula: BN (mg/dia) = [N_{ingerido} - (N_{fecal} + N_{urinário})] / 5.

Ao término do ensaio de digestibilidade, todos os cães foram mantidos por um período adicional de cinco dias para a colheita diária de fezes frescas, colhidas imediatamente após a defecação ou diretamente do reto do animal, quando necessário, para a determinação dos AGCC, pH e nitrogênio amoniacal fecais.

Para a aferição do pH fecal, um grama de fezes frescas (coletado imediatamente após a defecação) foi diluído em 5 mL de água miliQ e o pH avaliado em pHmetro digital de precisão 0,01pH (Modelo DM-22, Digimed Analítica Ltda, São Paulo, Brasil). Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos, empregando-se a média das três aferições obtidas.

Para determinar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico), 10 gramas de fezes frescas foram coletadas e rapidamente homogeneizadas e misturadas a 30 mL 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 4.500 G, durante 15 minutos, aproveitando-se o sobrenadante e desprezado o sedimento segundo ERWIN et al., (1961). As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer (-15°C) e, posteriormente, encaminhadas para análise ao Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – PR.

A concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes (acético, propiônico e butírico) foi determinada por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Trace GC Ultra – Thermo Scientific, EUA) com injetor automático, equipado com detector de ionização de chama a 240°C e coluna capilar de sílica fundida (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm, Restek 2560). Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste (vazão 1,2 mL/min.), nitrogênio como gás auxiliar (vazão 35mL/min.) e ar sintético e hidrogênio como gases combustíveis na vazão de 35 e 350 mL/min., respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65°C, mantida por 5 minutos, elevada até 170°C a uma taxa de 16°C/min.,

mantida por 7 minutos, chegando a 235°C de temperatura final. O volume de amostra utilizado foi de 1µL pipetado em vial (1,5 mL) acoplado ao injetor automático do cromatógrafo. O cálculo da concentração da amostra foi efetuado por comparação com a área dos picos formados pela solução, contendo o ácido padrão (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil).

O nitrogênio amoniacal das fezes foi determinado por adaptação do método de Kjeldahl, omitindo-se a fase de digestão. Para tanto, foram utilizados os extratos preparados para dosagem de AGCC. Os extratos foram descongelados à temperatura ambiente e, em seguida, alíquotas de 2 mL foram transferidas para tubo de ensaio, e diluídas em 13 mL de água destilada e submetidas à destilação em destilador de nitrogênio (Tecnal T-036/1 Piracicaba, Brasil). A destilação foi realizada com 5 mL de hidróxido de potássio KOH 2 mol/L e o nitrogênio recebido em um erlenmeyer com 10 mL de solução (ácido bórico 0,97 N). A seguir, procedeu-se a fase de titulação com HCL (0,005 N).

Para a avaliação da curva de uréia sérica pós-prandial, os cães foram assepticamente tricotomizados na veia cefálica (antebraço) e, em seguida, foi introduzido um cateter intravenoso tamanho 22GAx1,16” (BD Angiocath, Becton Dickinson, USA) heparinizado para coleta de sangue. Para isto, os animais foram mantidos em jejum por um período de 24 horas, porém, com fornecimento de água *ad libitum*. A primeira coleta foi realizada no tempo zero (jejum) e então, o alimento foi disponibilizado aos cães por 15 minutos e as coletas seguintes ocorreram nos tempos 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos após a alimentação, sendo o tempo considerado a partir do término da ingestão do alimento.

Em cada coleta, foram obtidos cerca de 1,5mL de sangue, o qual foi imediatamente transferido para tubos de ensaio de vidro sem anticoagulante e centrifugados a 2.000 rotações por minuto (rpm), por cinco minutos para separação do soro. Em seguida à centrifugação, o soro foi pipetado e transferido para tubos de eppendorf e armazenados em freezer à -15°C até o momento das análises. Para evitar a contaminação da amostra com heparina presente no cateter, aproximadamente 0,5 ml de amostra de sangue foi descartado no início de cada procedimento de coleta. A concentração de uréia sérica foi determinada usando-se kit comercial Uréia-PP (Analisa®, Belo Horizonte-MG), por meio do método enzimático-colorimétrico. Mediu-se a absorbância em Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível – UV-Vis (Aparelho Shimadzu modelo 1601PC) no LANA/UEM. A leitura pelo método

espectrofotométrico ocorreu a 600 nanômetros (nm). A concentração de uréia urinária também foi determinada, seguindo-se a mesma metodologia utilizada para a determinação da uréia no soro, porém, o valor obtido na dosagem foi multiplicado pelo fator 50, obtendo-se assim o valor de uréia urinária. Foi utilizada a amostra de urina coletada durante o ensaio de digestibilidade.

Os dados experimentais foram submetidos à Análise de Variância e testados quanto à sua distribuição normal, pelo teste Kolmogorov-Smirnov e igualdade de variâncias, pelo teste de Levene. Quando resultados da ANOVA foram considerados significativos, as médias das variáveis foram analisadas mediante teste de Tukey, considerando 5% de probabilidade. Para a avaliação das respostas séricas de uréia pós-prandiais, empregou-se um esquema de medidas repetidas no tempo, sendo avaliados os efeitos de período (tempo de coleta), tratamento e suas interações. As médias também foram comparadas pelo teste de Tukey considerando o nível de significância de 5%. A análise estatística foi conduzida, usando a função GLM do SAS versão 9.2 (SCHLOTZHAUER & LITTELL, 1997). Os resultados da curva de uréia sérica de todos os momentos de colheita foram transformados para área abaixo da curva (AAC) e posteriormente inseridos na análise estatística juntamente com as demais variáveis. Utilizou-se o software estatístico ORIGIN PRO 9.0 32-bit (OriginLab Data analysis and graphing software, Massachusetts, Estados Unidos) para proceder ao cálculo de AAC.

Resultados e Discussão

Neste estudo, procurou-se, por meio do delineamento proposto, verificar o efeito da fermentação intestinal de prebióticos sobre o metabolismo do nitrogênio em cães e, adicionalmente, verificar possíveis modificações no efeito biológico dos prebióticos quando submetidos ao processamento térmico. O consumo das dietas experimentais foi adequado e não houve ocorrências de diarreia e recusa do alimento durante o período experimental. O consumo de MS, MO, MM, PB, EEA, e EMA não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). Os animais consumiram, em média, $118,9 \pm 1,93$ kcal/kg^{0,75}/dia, sendo este consumo próximo do recomendado pelo NRC

(2006), de $130 \text{ kcal/kg}^{0,75}/\text{dia}$. Também não houve diferença ($P>0,05$) entre os CDA da MS, MO, PB, EEHA, ENN e EMA das dietas controle e com adição dos prebióticos ($p>0,05$). O consumo de nutrientes das três dietas experimentais e peso corporal dos animais, assim como os dados relativos aos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), energia metabolizável e balanço de nitrogênio das rações estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Peso corporal dos animais, consumo de nutrientes, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e energia metabolizável (EM) das dietas controle e das dietas com a inclusão dos prebióticos antes ou após o processo de extrusão

Item	Dietas				
	Controle	MOS/FOS antes ¹	MOS/FOS após ²	CV(%) ³	Valor de p
Peso corporal dos cães (kg)	14,2	14,8	13,5	15,1	0,5669
<i>Consumo de nutrientes (kg^{0,75}/dia) *</i>					
Matéria seca (g)	29,4	29,2	29,5	11,4	0,7163
Matéria orgânica (g)	26,2	25,9	26,3	11,4	0,3515
Matéria mineral (g)	3,25	3,29	3,19	11,5	0,3515
Proteína bruta (g)	9,75	9,20	9,84	11,2	0,8881
Extrato etéreo ácido (g)	5,67	5,41	5,57	11,3	0,6767
Energia metabolizável (kcal/kg ^{0,75} /dia)	121,4	121,6	121,3	11,4	0,5726
<i>Coefficiente de digestibilidade aparente *</i>					
Matéria seca	80,7	80,9	77,7	3,2	0,0942
Matéria orgânica	87,5	87,8	85,4	2,1	0,0809
Proteína bruta	81,9	82,5	78,9	3,2	0,0682
Extrato etéreo ácido	95,1	94,6	94,6	0,8	0,4707
Extrativos não-nitrogenados	89,0	89,9	86,6	2,5	0,0614
Energia metabolizável (Kcal/g)	4,08	4,12	3,97	3,1	0,1447

*Todas as amostras foram analisadas em duplicata aceitando-se um coeficiente de variação < 5%.

¹Mistura dos prebióticos mananoligossacarídeos (MOS) e frutoligossacarídeos (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle antes do processo de extrusão.

²Mistura de 1% de prebiótico fonte de mananoligossacarídeo (MOS) e frutoligossacarídeo (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle após o processo de extrusão.

³Coefficiente de variação.

PROPST et al., (2003) e SWANSON et al. (2002b), não encontraram alteração nos CDA total dos nutrientes, em cães suplementados com uma combinação de 1g de FOS e 1g de MOS por dia na dieta. FLICKINGER et al.(2003), também não encontraram diferença na digestibilidade em cães suplementados com até 0,5% FOS por dia.

Os FOS podem ser classificados como um tipo de fibra dietética solúvel, entretanto, não aumentam a viscosidade do conteúdo intestinal, possivelmente não afetando significativamente a digestibilidade dos nutrientes quando suplementados em baixos níveis (SWANSON et al., 2002b); FLICKINGER et al., 2003). Ainda, GOMES et al. (2009) observaram ausência de efeito da parede celular de levedura (PCL) sobre os CDA da MS, PB, EEA, MO, ENN e EB. Por outro lado, ZENTEK et al. (2002) observaram diminuição no CDA da PB, ENN e MS em cães suplementados com 1 grama de MOS por Kg de peso corporal por dia. Estes achados foram atribuídos pelos autores à diminuição do tempo de trânsito intestinal, efeito comum de fibras fermentáveis e, ao aumento da síntese celular bacteriana, como conseqüente aumento da biomassa microbiana das fezes.

Em estudo realizado por KANAKUPT et al. (2011), não foram encontradas diferenças na digestibilidade aparente total da MS, MO, EEHA e energia metabolizável em gatos, recebendo uma mistura de 0,5% de FOS e 0,5% de GOS incluídos na dieta antes da extrusão. No entanto, os autores relataram menor digestibilidade da PB para o mesmo tratamento. Segundo os autores, esta diminuição está relacionada a uma maior produção de biomassa bacteriana no intestino grosso dos animais que receberam este tratamento, aumentando, desta forma, as perdas endógenas e, conseqüentemente, reduzindo a digestibilidade aparente da PB. BARRY et al. (2009) relataram que a digestibilidade da PB no íleo de cães aumentou linearmente em dietas suplementadas com 0,2 ou 0,4% de inulina, no entanto, os valores não foram afetados quando houve a suplementação de 0,2 ou 0,4 % de FOS.

Como pode ser observado, os resultados encontrados nos estudos são controversos e podem estar relacionados, dentre outros fatores, com as diferentes características dos ingredientes fontes de prebióticos, com a dosagem empregada, entre outros. Ainda que os prebióticos possam afetar a digestibilidade dos nutrientes, estas alterações parecem ser mínimas e isto não está entre os objetivos principais com a sua utilização em petfood, que são: regulação adequada da microbiota intestinal; fornecimento de substrato energético para os colonócitos (butirato);

redução da formação intestinal de compostos resultantes da fermentação protéica, tais como indóis, fenóis, amônia, aminas, entre outros.

Uma vez que os prebióticos afetam a fermentação intestinal de proteína, espera-se que modifiquem o metabolismo do nitrogênio. Neste estudo, para verificar esta hipótese foram avaliadas a concentração fecal de amônia, balanço orgânico de nitrogênio, concentrações urinárias de uréia e curva de uréia sérica pós-prandial. Todos os tratamentos apresentaram BN positivo, resultado esperado devido ao elevado teor de proteína das dietas. Segundo HENDRIKS et al. (1997), citado pelo NRC (2006), os cães adultos em manutenção necessitam, aproximadamente, 210 mg/kg^{0,75}/dia para manter o BN neutro, o que corresponde à ingestão de uma dieta com 4000 kcal/kg, contendo aproximadamente 80g/kg de Proteína Bruta. Neste estudo, os alimentos apresentaram acima de 300g/kg de Proteína Bruta, o que favoreceu os elevados valores de BN. Na Tabela 7, estão disponíveis os dados relativos ao consumo, absorção, excreção e retenção de N dos cães, assim como o BN.

Tabela 7 – Consumo, absorção, excreção e retenção de N e BN dos cães

Item (g/kg ^{0,75} /dia) *	Controle	MOS/FOS ¹ antes	MOS/FOS ² após	CV(%) ³	Valor de p
N ingerido	1,55 ^b	1,47 ^c	1,57 ^a	0,13	<0,0001
N excretado fezes	0,22	0,21	0,26	14,05	0,0559
N excretado urina	0,178	0,182	0,207	40,39	0,7811
N retido	1,15	1,07	1,10	7,81	0,2986
N retido: N absorvido (%) *	86,52	85,47	84,07	6,98	0,7783
BN (mgN/kg ^{0,75} /dia) ^{4*}	1150	1070	1100	7,81	0,2986

*Todas as amostras foram analisadas em duplicata aceitando-se um coeficiente de variação < 5%.

¹Mistura dos prebióticos mananoligossacarídeos (MOS) e frutoligossacarídeos (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle antes do processo de extrusão.

²Mistura de 1% de prebiótico fonte de mananoligossacarídeo (MOS) e frutoligossacarídeo (FOS) na proporção de 1:1 adicionados a 1% da dieta controle após o processo de extrusão.

^{a,b,c} Médias com mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

³Coeficiente de variação.

⁴ Nitrogênio ingerido – (Nitrogênio fecal + Nitrogênio urinário), dado em gramas por Kilograma de peso metabólico(kg^{0,75}) por dia.

O elemento N está presente no corpo na forma de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas, vitaminas, hormônios, anticorpos, enzimas, uréia, amônia e diversos outros compostos. O N é excretado do corpo principalmente como proteína não digerida e proteína microbiana nas fezes, assim como, na forma de uréia na urina, a qual é produzida no fígado a partir do catabolismo de aminoácidos e do metabolismo hepático da amônia de origem intestinal.

Parte da uréia produzida pelo organismo segue ao intestino, porém, nem toda uréia é excretada com as fezes, devido à presença da urease bacteriana no intestino grosso, a qual quebra a molécula de uréia formando amônia, CO₂ e água. A maior parte da amônia é reabsorvida e metabolizada no fígado pela enzima carbamoil fosfato sintetase, e finalmente para uréia novamente, que será, finalmente, excretada na urina (FULLER et al., 2004). No entanto, a formação e absorção da amônia intestinal a partir da uréia depende da atividade da urease e das condições de pH favoráveis. Sabe-se que, aproximadamente, 99% da amônia formada diariamente no intestino grosso é absorvida por mecanismo de difusão não-iônica pelos colonócitos. No entanto, à medida que o pH intestinal diminui, a capacidade de difusão intestinal da amônia para o sangue portal também é reduzida, sendo excretada mais amônia nas fezes (ARNOLD & SCHAD, 1954.; CUMMINGS, 1976).

Considerando que a amônia no organismo pode ser utilizada para a síntese de aminoácidos ou de uréia, espera-se que a maior absorção intestinal deste composto possa elevar as concentrações plasmáticas de uréia.

Neste estudo, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) nas concentrações fecais de amônia (Tabela 8), semelhante ao verificado por FABER et al. (2011) e KANKUPT et al. (2011), utilizando prebióticos em cães e gatos, respectivamente. Por outro lado, ZENTEK et al. (2002), trabalhando com MOS em dietas para cães, verificaram que os animais suplementados apresentaram redução nas concentrações fecais de amônia e HESTA et al. (2003), diferente de todos os outros, verificaram ainda maior excreção fecal de amônia em cães alimentados com uma dieta com alto nível de proteína e 3% de FOS. Como pode ser verificado, este assunto é ainda muito controverso, mas considerando que a maior parte da amônia produzida é absorvida pelas células da mucosa intestinal, sua quantificação nas fezes pode não ser um bom indicador da atividade fermentativa neste órgão, pois o aumento ou redução nas concentrações fecais pode ser erroneamente interpretado, quando avaliado isoladamente.

Os parâmetros fecais e urinários dos cães encontram-se na Tabela 8. O escore fecal dos cães não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$). Escore fecal com valores entre 3 e 4 são considerados ideais, sendo este, um aspecto importante para donos de cães, pois, qualquer mudança negativa no escore fecal pode ser visto como prejudicial para a utilização de um determinado ingrediente. Baixo nível de suplementação de frutano parece não alterar a qualidade fecal de cães (BARRY et al., 2009).

Tabela 8 - Parâmetros fecais e urinários dos cães alimentados com dieta controle e com a inclusão dos prebióticos antes ou após a extrusão

Item*	Controle	MOS/FOS antes	MOS/FOS após	CV(%) ^{3**}	Valor de P ^{**}
Escore fecal	3,83	4,00	4,00	5,97	0,3911
pH das fezes frescas	7,09 ^a	6,67 ^b	6,74 ^b	2,1	0,0004
Amônia fecal (mg/g na MS)	12,07	13,2	12,4	13,9	0,7056
<i>AGCC (mmol/kg de MS)²</i>					
Ácido acético	276,8	294,9	378,8	4,17	0,1555
Ácido propiônico	121,8	151,1	191,2	7,47	0,4280
Ácido butírico	127,6	200,4	219,7	10,93	0,6701
AGCC Totais	526,3	646,4	789,7	5,38	0,3560
Excreção de Uréia urinária (mg/kg ^{0,75} /dia)	40,2	35,7	40,6	21,22	0,5315

* Todas as amostras foram analisadas em duplicata aceitando-se um coeficiente de variação < 5%.

^{a, b} Médias com mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

¹ Escore: 1: fezes pastosas e sem forma a 5 :fezes bem formadas, duras e secas.

² Ácidos graxos de cadeia curta.

³ Coeficiente de variação.

** Os dados numéricos do CV (%) e valor de P para os AGCC, foram transformados em logaritmo na base 10.

A inclusão dos prebióticos nas dietas levou a redução do pH das fezes ($p < 0,05$) dos cães em relação à dieta controle, não havendo, no entanto, diferença ($P > 0,05\%$) entre os momentos da adição dos prebióticos nas formulações. Resultados semelhantes foram reportados por TWOMEY et al. (2003), os quais relataram diminuição do pH das fezes com a inclusão de 3% de FOS na dieta de cães adultos, como consequência do aumento das concentrações de lactato nas fezes. A produção de ácidos pelas bactérias lácticas é um mecanismo que pode influenciar a concentração de ácidos nas fezes e, conseqüentemente, o pH fecal.

Todas as fontes de inulina e FOS são altamente fermentáveis com capacidade de promover o crescimento de bactérias lácticas, resultando em altas concentrações de lactato e AGCC no intestino, resultando em diminuição do pH intestinal e, por conseguinte, do pH das fezes (SWANSON & FAHEY, 2006). No presente estudo, não foram quantificados o número de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp, apesar disso, o menor pH das fezes dos cães alimentados com as dietas contendo a mistura dos prebióticos pode estar relacionado com o aumento e atividade destes microrganismos no intestino grosso dos cães. BEYNEN et al., (2002) encontraram aumento da concentração de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nas fezes de cães alimentados com 1% de FOS, em relação aos cães que receberam a dieta controle. SWANSON et al.(2002a), também observaram maior concentração de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., e bactérias aeróbias totais, além de ácido láctico e butirato e menor concentração de *Clostridiumperfringens* nas fezes de cães suplementados com 4 g de FOS e 2 g de MOS por dia, durante 14 dias. Neste estudo, não foram verificadas diferenças nas concentrações fecais de AGCC entre os tratamentos, embora os tratamentos com prebióticos tenham apresentados valores numericamente maiores para estes parâmetros. Estes resultados são semelhantes aos observados por SWANSON et al., (2002) e ZENTEK et al. (2002), que não encontraram diferença quanto aos AGCC nas fezes de cães adultos suplementados com prebióticos na dieta.

Neste estudo, associou-se as concentrações séricas e urinárias de uréia com o propósito de melhorar o entendimento sobre o efeito dos prebióticos sobre a formação e absorção intestinal de amônia. Os resultados das concentrações de uréia sérica pós-prandial dos cães em jejum e após a alimentação mediante consumo das dietas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Uréia sérica pós-prandial (mg/dL) dos cães alimentados com dieta controle e com a inclusão dos prebióticos antes ou após a extrusão

Item	Controle	MOS/FOS antes	MOS/FOS após	Média	EPM ¹
<i>Tempo da coleta (horas)</i>					
0 (jejum)	30,4 ^{eA}	32,7 ^{dA}	32,2 ^{cA}	31,7	1,3
1	37,5 ^{cdeA}	39,2 ^{cdA}	36,3 ^{bcA}	37,6	1,6
2	42,6 ^{cdA}	43,8 ^{bcA}	43,4 ^{bA}	43,3	2,0
3	60,1 ^{abA}	53,7 ^{aA}	54,6 ^{aA}	56,1	1,9
4	65,1 ^{abA}	56,6 ^{aA}	57,3 ^{aA}	59,7	1,6
5	64,2 ^{abA}	63,0 ^{aA}	61,4 ^{aA}	62,8	2,0
6	62,4 ^{abA}	61,1 ^{aA}	58,3 ^{abA}	60,6	2,0
7	66,5 ^{aA}	58,2 ^{aB}	53,2 ^{abC}	59,3	2,3
8	57,7 ^{abA}	53,7 ^{aA}	50,9 ^{abA}	54,1	2,2
9	56,1 ^{abA}	51,8 ^{bcA}	49,6 ^{bA}	52,5	1,8
10	55,4 ^{bA}	46,7 ^{bcA}	47,1 ^{bA}	49,7	2,0
11	53,4 ^{bA}	43,9 ^{bcA}	42,9 ^{bA}	46,7	2,1
12	45,2 ^{bcA}	37,5 ^{cdA}	38,8 ^A	40,5	1,8
Média	53,6	49,4	48,1	-	-
EPM ¹	1,6	1,2	1,2	-	-
AAC uréia ²	709,9 ^A	607,3 ^A	590,1 ^A	635,7	43,5
AAC incremento ³	296,3 ^A	213,8 ^B	204,3 ^B	238,1	12,3
Pico uréia	66,5	63,0	61,4	62,8	3,8
Pico incremento	41,9 ^A	31,4 ^B	30,6 ^B	34,6	1,3
Tempo do pico da uréia	5,1	5,1	5,0	5,0	0,4

^{A,B,C,D e a,b,c,d} Médias com mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

¹Erro padrão da média.

²Área abaixo da curva da uréia.

³Área abaixo da curva do incremento.

Como pode ser verificado na Tabela 9, os tratamentos com prebióticos apresentaram menor concentração de uréia sérica, em relação ao Controle ($p < 0,05$), visto pelas AAC de uréia (Tabela 9) e de incremento de uréia (Figura 5). Foi observada também diferença na concentração de uréia sérica entre os períodos pós-prandiais de ingestão dos alimentos. A partir de uma hora da ingestão do alimento, houve aumento das concentrações deste metabólito no sangue, sendo este, um comportamento fisiológico esperado após a alimentação. MATSUOKA et al. (1990) citado por ZENTEK (2002) verificaram em Beagle, que a ingestão de lactulose diminuiu a absorção de compostos nitrogenados, resultando na redução das concentrações sanguíneas de amônia na circulação portal. Neste estudo, acredita-se que a redução da uréia sérica dos animais que consumiram dietas contendo prebióticos antes ou após a extrusão tenha ocorrido devido à redução na formação intestinal de amônia e na sua posterior absorção intestinal. Uma vez que a ingestão de proteína tenha sido a mesma entre os tratamentos e que a digestibilidade desta proteína também não tenha diferido, esta hipótese é a mais provável, visto pela redução no pH fecal dos animais que consumiram os prebióticos MOS/FOS, que por sua vez reduz a formação e absorção intestinal de amônia (CUMMINGS, 1976).

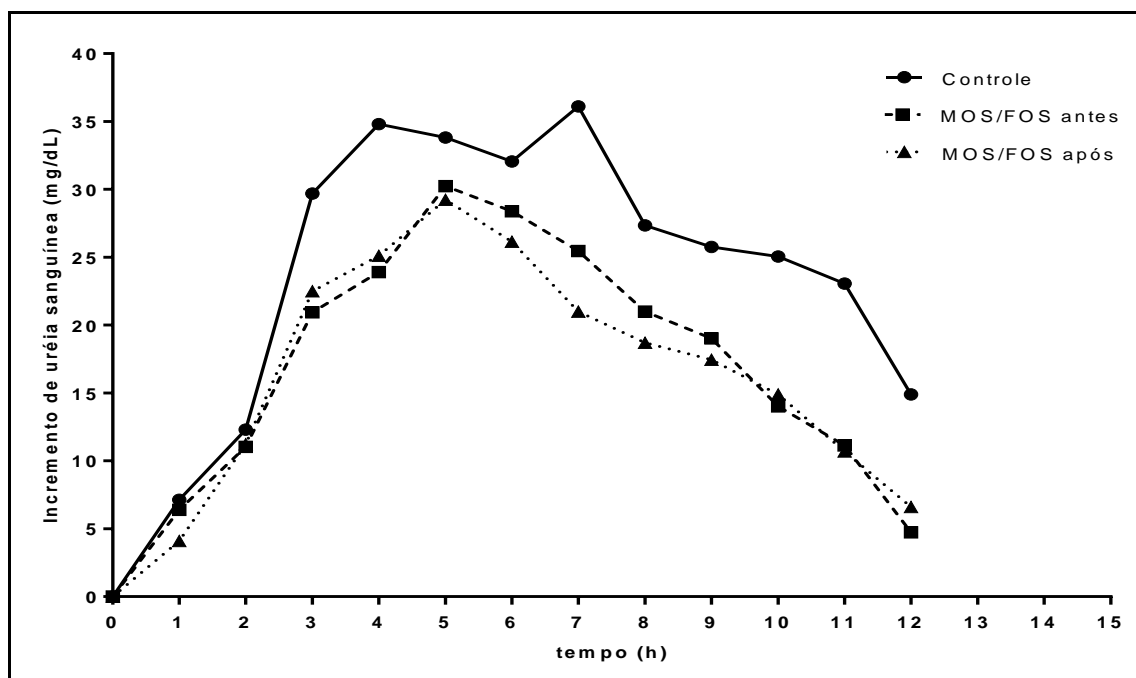


Figura 5 – Incrementos de uréia sérica pós-prandial dos cães alimentados com dieta controle e com inclusão da mistura dos prebióticos antes ou após a extrusão

A redução na formação de amônia por bactérias no intestino é importante para manter o pH intestinal mais baixo, favorecendo o estabelecimento de bactérias benéficas em detrimento das potencialmente patogênicas e fermentadoras de proteínas. Atualmente, sabe-se que alguns produtos de fermentação protéica, quando em excesso, contribuem com o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios intestinais e câncer de cólon. Uma vez que os alimentos para cães e gatos apresentam elevadas concentrações de proteína, os prebióticos podem trazer benefícios, devido à produção de AGCC e manutenção da microbiota potencialmente patogênica controlada (SEGAIN et al., 2000; HAMER et al., 2008). Outro benefício dos prebióticos verificado neste estudo foi a possível redução na absorção intestinal de amônia e, conseqüentemente, nas concentrações séricas de uréia. Este achado é importante para a nutrição clínica, uma vez que na insuficiência hepática ou nos *shunts* porto-sistêmicos, a prevenção da toxicidade da amônia é um dos objetivos do tratamento clínico, conseguido por meio da restrição protéica e com o uso da lactulose (HAND, 2010). É possível que os MOS e FOS também apresentem benefícios neste sentido. Em outros distúrbios, como na insuficiência renal crônica, um dos objetivos do tratamento é prevenir o acúmulo de uréia no organismo (HAND, 2010) e desta forma os prebióticos também podem apresentar benefícios. A aplicação dos prebióticos pela indústria é facilitada quando empregada na massa da ração, antes da extrusão. No entanto, é possível que o processamento térmico durante a extrusão (110-130 °C) e secagem (aproximadamente 100 °C) possam modificar a atividade biológica deste ingrediente. BOURNET (1996) verificou que acima de 135 °C são verificadas perdas significativas de inulina no processamento. No entanto, este autor verificou ainda que estas perdas ocorrem após, aproximadamente, 5 minutos do alimento nesta faixa de temperatura. A extrusão na qual os alimentos para cães são submetidos, embora apresente elevadas temperaturas, o mesmo permanece apenas por alguns segundos nestas condições, o que provavelmente tenha preservado a estrutura dos prebióticos. Desta forma, neste estudo não foi verificado efeito do processamento sobre o efeito biológico dos prebióticos MOS e FOS associados.

Conclusões

A utilização de prebióticos na dieta não altera os CDA dos nutrientes e EMA. Também não afeta as concentrações de amônia fecal e balanço de nitrogênio, porém as concentrações de uréia sérica pós-prandial são reduzidas com a ingestão de prebióticos. Os prebióticos nas dosagens empregadas neste estudo, não alteram as concentrações de AGCC das fezes, porém reduzem o pH fecal. O processo de extrusão não modifica os efeitos biológicos dos prebióticos sobre os parâmetros avaliados nos cães.

Literatura citada

- ARNOLD, A.; SCHAD, J. S. Nitrogen balance studies with dogs on casein or methionine-supplemented casein. **Journal of Nutrition**, v. 53, p. 265–273, 1954.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Official Publications 2003**. Association of American Feed Control Officials, 2004.
- BARRY, K. A. et al. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. **Journal of Animal Science**. v. 87 p. 3244-3252, 2009.
- BARRY, K. A. et al. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **Journal of Animal Science**. v. 88, p. 2978-2987, 2010.
- BELOSHAPKA, A. N. et al. Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. **British Journal of Nutrition**, p. 1-7, 2011.
- BELOSHAPKA, A. N. Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. **Am. J. Vet. Res.** 73 p.1016-1023, 2012.
- BIRKETT, A.; FRANCIS, C. Short-Chain Fructo-oligosaccharides: A low Molecular Weight Fructan. In S. Cho, *Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients: Health Benefits and Food*. (pp. 14-38). **CRC Press**, 2009.
- BÖHM, A. et al. Heat-induced degradation of inulin. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 466-471, 2005.
- BORNET, F.R.J. Non-digestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p.7635–7695, 1994.
- BOSH, G. The effects of dietary fibre type on satiety-related hormones and voluntary food intake in dogs. **British Journal of Nutrition**, v.102, p. 318–325, 2009.
- BOUHNIK, Y. et al. Administration of trans-galactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 444–448, 1997.
- BLACHIER, F. et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **AminoAcids**, v.33, p. 547–562, 2007.
- BUDDINGTON, R.K. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.646–51, 2003.

CAMPBELL, J. M. et al. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH, and microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p.130- 136, 1997a.

CAMPBELL, J. M. Selected Fructooligosaccharide (1-kestose, Nystose, and 1-Fructofunarosyl-nystose) Composition of Food and Feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3076-3082, 1997b.

CASE, L. P. et al. Desenvolvimento e tratamento da obesidade. In: CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. **Nutrição canina e felina: manual para profissionais**. Harcourt: Brace, p. 247-268, 1998.

CUMMINGS, J. H. Changes in faecal composition and colonic function due to cereal fibre. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.29, p.1468-1473, 1976.

CUMMINGS, J. H. et al. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 32, p. 2094–2101, 1979.

CUMMINGS, J.H. Short-chain fatty acids. In: **The large intestine in nutrition and disease**. Edited Institut Danone, Bruxelles (Belgique) p. 199, 1997.

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.

CUTRIGNELLI, M.I. Functional foods: can the diet increase longevity and well being of animal? In: III Congresso Internacional sobre Nutrição de Animais de Companhia, 2011, **Anais...**São Paulo:CBNA, 2011.

CHRISTOPHE M. et al. Delcour. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 112, p. 831-837, 2009.

CRITTENDEN, R.G. 2006. Emerging prebiotic candidates. **In Prebiotics: Development and application**, ed. G.R. Gibson and R.A. Rastall. West Sussex: Wiley.

DASS, N. B., et al. The relationship between the effects of short-chain fatty acids on intestinal motility in vitro and GPR43 receptor activation. **Neurogastroenterol Motil**, v.19, p. 66–74, 2007.

DAVIS, C. P. et al. Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 34, p. 194–206, 1977.

DUAR. R. M. Adaptation and Validation of Food Product Specific Analytical Methods for Monitoring Prebiotics Present in Different Types of Processed Food Matrices. **Dissertations & Theses in Food Science and Technology**, 2011.

EL-DASH, A.A. Application and control of thermoplastic extrusion of cereals for food and industrial uses. In: POMERANZ, Y.; MUNCH, L. **Cereals a renewable resource: theory and practice**. St. Paul: AACC, cap. 10, p. 165-216, 1982.

ERWIN, E.S. et al. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771, 1961.

FABER, T. A. et al. Galactoglucomannan oligosaccharide supplementation affects nutrient digestibility, fermentation end-product production, and large bowel microbiota of the dog. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 103-112, 2011.

FULLER, M. F. et al. Nitrogen metabolism In: **The encyclopedia of farm animal nutrition**. CAB International Publishing, 606p, 2004.

FURLAN, R. L. et al. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: 5º SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 2004. **Anais...** Balneário Camboriú, SC. 2004.

GAGGIA, F. et al. Review: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies, University of Bologna, Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p.15–28, 2010.

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., ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. v.125, p.1401–1412, 1995.

GIBSON, G. R., et al, Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. **Proceedings of the Nutrition Society**, Symposium 2, v. 55, p. 899-912, 1996.

GIBSON, G.R. et al. **Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria implications for health**. In : SILVA, A.S.S.; HAAS, P.; SARTORI, N.T.; ANTON, A.A.; FRANCISCO, A.. Frutooligossacarídeos: Fibras Alimentares Ativas. B.CEPPA, Curitiba, v.25, n.2, pág. 295-304. 2007.

GOMES, M.O.S. 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. **Tese mestrado** Jaboticabal, 2009 79 f.: il.

GOUVEIA, E.M.F. et al. Uso de mannanoligossacarídeos fosforilados (Bio-MOS(R)) como adjuvante em doenças gastrointestinais em cães. **Revista Pet South América**, jan-fev, 2006.

GUYTON, A. C. Fisiologia gastrintestinal , Unidade XII, cap. 65. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. Ed. Guanabara koogan, 1996.

GUYTON, A. C; HALL J. E. **Textbook of medical physiology**, 9. Ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA, p. 877-882, 1996.

GRIESHOP, C.M. et al. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. **Archives of Animal Nutrition**, v.58, p.483–493, 2004.

HAMER, H. M., et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 104–119, 2008.

HAND, M. S. et al. **Small Animal Clinical Nutrition**.5th edition, Mark Morris Institute, Topeka-Kansas, v.1, p.313, 2010.

HESTA, M. et al. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p.1007–1014, 2003.

HIDAKA, H. et al. The effects of undigestible fructooligosaccharides on intestinal microflora and various physiological functions on human health. In: Furda. I ed. **New Development in Dietary Fiber**. New York: Plenum press, p.105, 1990.

HUSSEIN, S.H. et al. Selected fructooligosaccharide composition of pet-food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.128, p.2803-2805, 1998.

HOFER, K.; JENEWEING, D. Enzymatic determination of inulin in food and dietary supplements. **European Food Research and Technolgy**, v. 209, p. 423-427, 1999.

HUEBNER, J. et al. Efficacy of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 287-293, 2008.

HUGHES, R. Protein Degradation in the Large Intestine: Relevance to Colorectal Cancer. **Curr. Issues Intest. Microbiol**. V. 1, n 2, p.51-58, 2000.

HUSSEIN, S.H. et al. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1454-1456, 1999.

KANAKUPT, K. Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adult cats. **J ANIM SCI**, v. 89, p. 376-1384, 2011.

KAUR, N. et al. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition; **J. Biosci**. v. 27, p.703–714, 2002.

KIL, D. Y.; Swanson K. S. Companion Animals Symposium: Role of microbes in canine and feline health. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1498-1505, 2011.

KIM, G.B. et al. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**, v.90, p.75–82, 2011.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 612p, 1984.

LEWIS, S.; COCHRANE, S. Alteration of sulfate and hydrogen metabolism in the human colon by changing intestinal transit rate. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 102, p. 624–633, 2007.

LIN, H. C.; VISEK, W. J. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. **J. Nutr.**, v. 121, p. 887–893, 1991.

LOMAX, A.R.; CALDER, P.C. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: **British Journal of Nutrition**, v.101, p. 633–658, 2009.

MACFARLANE G. T.; CUMMINGS, J. H. Protein Degradation by Human Intestinal Bacteria. **Journal of General Microbiology**. Printed in Great Britain 1647, v. 132, p. 1647-1 656, 1986.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrintestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000. **Anais...** Campinas: FACTA, v.2, p.161-174, 2000.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Proteolysis and amino acid fermentation. In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, **Physiology and Pathology**. G. R. Gibson.; G. T. Macfarlane, editors. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 75-100. 1995.

MANNING, T.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p, 287-298, 2004.

MATUSEK, A. Effect of temperature and pH on the degradation of fructo-oligosaccharides. **European Food Research and Technology**, v. 228, p.355-365, 2009.

MIDDELBOS, I.S. et al. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dog in comparison to fiber standards. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3033- 3044, 2007^a.

MIDDELBOS, I.S. et al. A dose-response evaluation of spray dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, p. 3022-3032, 2007^b.

MURRAY, S.M. et al. Evaluation of selected high-starch flours as ingredients in canine diets. **Journal Animal Science**. v.77, n.8, p.2180-2186, 1999.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. National Academy Press. Washington, 2006, 426p.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**.Bethesda, v.129, suppl.7, p.1402S-1406S, 1999.

OGUEKE, C.C., Probiotics and Prebiotics: Unfolding Prospects for Better Human Health. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.9, n. 9,p. 833-843, 2010.

PALFRAMAN, R. et al. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. **Applied Microbiology**, v. 37, p. 281–284, 2003.

PASSOS, L.M.M.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v.33,n.2, p.385-390, 2003.

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

PATURI, G. et al. Evaluation of gastrointestinal transit in rats fed dietary fibres differing in their susceptibility to large intestine fermentation. **Journal of functional foods**, v. 4, p. 107 –115, 2012.

PROPST, E. L. et al. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs.**Journal of Animal Science**, v.81, p. 3057-3066, 2003.

RITCHIE, L. E. et al.. Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. **Vet. Microbiol**, v.144, p.140–146, 2010.(ABSTRAT).

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.830-837, 2007.

ROBERFROID, M. et al.Prebiotic concept and health.**British Journal of Nutrition**, v. 104, p.1- 63, 2010.

SAAD, F.M.O.B. et al. Curso de Pos-graduacao “Lato Sensu” (Especializacao) a Distancia – **Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos**. UFLA/FAEPE, Lavras, p.129, 2005.

SAAD, S. M. I.Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 42, n.1, jan./mar, 2006.

SÁ-FORTES, C.M.L. **Valor nutricional de ingredientes energéticos e protéicos para cães**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2005. 82p. **Tese** (Doutoradoem Zootecnia)- Universidade Estadual Paulista, 2005.

SEGAIN, J-P. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *International Journal of Gastroenterology and Hepatology (Gut)*, v.47, p.397–403, 2000.

SILVA, A.S.S. et al. Frutooligosacarídeos: Fibras Alimentares Ativas. **B.CEPPA**, Curitiba, v.25, n.2, pág. 295-304, 2007.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. Ed. Viçosa: Ed. UFV, P. 235, 2002.

SIMPSON, J.W. Diet and Large Intestinal Disease in dogs and cats. **Journal of Nutrition**.v.128, p.2717-2722, 1998.

SIMPSON, J. M. et al. Characterization of fecal bacterial populations in canines: Effects of age, breed and dietary fiber. **Microb. Ecol**, v. 44, p. 186–197, 2002.

SBAF: Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais–Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. Disponível em <<http://www.sba.org.br>> acesso em: 24/06/2011.

SMITH, E. A. & MACFARLANE, G. T. Formation of phenolic and indolic compounds by anaerobic bacteria in the human large intestine. **Microb.Ecol**. V. 33, p.180–188, 1997.

SPIEGEL, J.E. et al. **Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients**. In: SILVA, A.S.S.; HAAS, P.; SARTORI, N.T. et al. Frutooligosacarídeos: Fibras Alimentares Ativas. B.CEPPA, Curitiba, v.25, n.2, pág.295-304, 2007.

SPRING, P. et al. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p. 205-211, 2000.

SWANSON, K. S. et al. Fructooligosaccharides and lactobacillus acidophilus modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy Adult dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.3721–3731, 2002a.

SWANSON, K. S. et al. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in large bowel of dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.980-989, 2002b.

SWANSON K. S.; FAHEY, G. C. Prebiotic Impacts on Companion Animals. In: **Prebiotics: Development & Application**. Gibson G.R. & Rastall R.A. Ed. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, 266 p., 2006.

SUCHODOLSKI, J. S. Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. In: COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM. **The Journal of Animal Science**, v. 89, p.1520-1530, 2011.

SCHLOTZHAUER, S.; LITTELL, R.C. **SAS system for elementary statistical analysis**. 2nd. ed. Cary: Sas institute.. p. 456, 1997.

TESHIMA, E. Aspectos terapeuticos de probioticos, prebioticos e simbioticos. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Vicosá, 2003.p.35-60, 2003.

UENO, K. et al. Functional Characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH). In: Edible Burdock. **Chemistry Central Journal** ,v.5, p. 1-9, 2011.

VAN LOO, J. et al. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII – CT94-1094). **British Journal of Nutrition**, v.81, p.121-132, 1998.

VENTER, C. S. Prebiotics: an update. **Journal of Family Ecology and Consumer Sciences**, Vol 35, p. 9, 2007.

VICKERS, R.J.; SUNVOLD, G.D., KELLEY, R.L. et al. 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.

VINCE, A. J; BURRIDGE, S. M. Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. **The Journal of Medical Microbiology** v. 13, No. 2, p. 177-191, 1980.

WALTER, M. et al. Biological response of rats to resistant starch. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.252-257, 2005.

WINDEY, K.; PRETER, V. D.; VERBEKE, K. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, p. 184-196, 2012.

WRONG, O. M; VINCE, A. J. Urea and ammonia metabolism in the human large intestine. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 43, p. 77-86, 1984.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, v.19, p. 107-117, 1996.

ZENTEK, J. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. III. In vitro studies on the metabolic activities For the small-intestinal microflora. **J. Anim Physiol Anim Nutr**, v. 74, p. 62-73, 1995.

ZENTEK, J. et al. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.1682-1684, 2002.